(19) Евразийское патентное ведомство

(21) 202191263 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2022.01.27

(22) Дата подачи заявки
2019.11.04

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

(54) ОТБОР УЛУЧШЕННЫХ ОПУХОЛЕРЕАКТИВНЫХ Т-КЛЕТОК

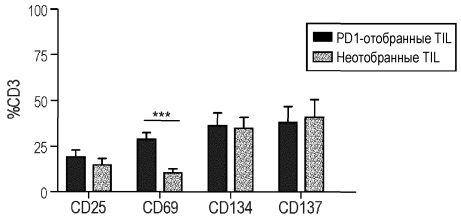
(31) **62/756,006; 62/826,831; 62/903,629; 62/924,602**
(32) **2018.11.05; 2019.03.29; 2019.09.20; 2019.10.22**
(33) **US**
(86) **PCT/US2019/059716**
(87) **WO 2020/096986 2020.05.14**
(88) **2020.06.18**

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

(72) Изобретатель:
Симпсон-Абельсон Мишель, Натараджан Арвинд, Шартье-Курто Сесиль, Полсон Матт (US)

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

(57) В настоящем изобретении предложены способы предварительного отбора TIL на основе экспрессии PD-1, а также способы экспансии указанных предварительно отобранных положительных по PD-1 TIL для получения терапевтических популяций TIL с повышенной способностью к уничтожению опухоли (например, повышенной цитотоксичностью).



202191263 A1

202191263 A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-568613EA/026

ОТБОР УЛУЧШЕННЫХ ОПУХОЛЕРЕАКТИВНЫХ Т-КЛЕТОК

ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

[0001] Данная заявка испрашивает приоритет на основании предварительной заявки на патент США № 62/756006, поданной 5 ноября 2018 г., предварительной заявки на патент США № 62/826831, поданной 29 марта 2019 г., предварительной заявки на патент США № 62/903629, поданной 20 сентября 2019 г., и предварительной заявки на патент США № 62/924602, поданной 22 октября 2019 г., которые полностью включены в настоящий документ посредством ссылки.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[0002] Лечение массивных, рефрактерных форм рака с использованием адоптивного переноса опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов (TIL) является высокоэффективным подходом терапии для пациентов с плохим прогнозом. Gattinoni, *et al.*, *Nat. Rev. Immunol.* **2006,** *6,* 383-393. Для успешной иммунотерапии требуется большое количество TIL, а для коммерческого применения необходим устойчивый и надежный процесс. Удовлетворение этой потребности было сложной задачей из-за технических, логистических и регуляторных проблем, связанных с экспансией клеток. Экспансия TIL на основе IL-2 с последующим «процессом быстрой экспансии» (REP) стала предпочтительным методом экспансии TIL из-за ее быстроты 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 обеспечить 1000-кратную экспансию TIL в течение 14-дневного периода, хотя для этого требуется большой избыток (например, 200-кратный) облученных аллогенных мононуклеарных клеток периферической крови (МНПК, также известных как мононуклеарные клетки (МНК)), часто от множества доноров, в качестве фидерных клеток, а также антитело к CD3 (OKT3) и высокие дозы IL-2. Dudley, *et al., J. Immunother.* **2003,** *26,* 332-42. TIL, прошедшие процедуру REP, обеспечивали успешную адоптивную клеточную терапию после иммуносупрессии хозяина у пациентов с меланомой. Текущие параметры приемлемости инфузии зависят от показателей состава TIL (например, положительности на CD28, CD8 или CD4), а также от кратности экспансии и жизнеспособности продукта REP.

[0003] Существующие процессы Qпроизводства TIL ограничены продолжительностью, стоимостью, вопросами стерильности и другими факторами, описанными в настоящем документе, так что потенциал коммерческого использования таких процессов существенно ограничен. Хотя было проведено определение характеристик TIL, например, было показано, что TIL экспрессируют различные рецепторы, включая ингибирующие рецепторы программируемой клеточной смерти 1 (PD-1; также известный как CD279) (см. Gros, A., et al., Clin Invest. 124(5):2246-2259 (2014)), полезность этой информации для разработки терапевтических популяций TIL еще предстоит полностью осознать. Существует острая потребность в обеспечении процессов производства TIL и

способов лечения, основанных на таких процессах, которые подходят для производства в коммерческих масштабах и одобрения регулирующих органов для применения у людей в нескольких клинических центрах. Настоящее изобретение удовлетворяет эту потребность, предлагая способы предварительного отбора TIL на основе экспрессии PD-1, чтобы получить TIL с повышенной специфичной способностью к уничтожению опухоли (например, повышенной цитотоксичностью).

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0004] Согласно настоящему изобретению предложены способы экспансии TIL и получения терапевтических популяций TIL, которые включают этап предварительного отбора на основе статуса PD-1.

[0005] В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен способ экспансии опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов (TIL) в терапевтическую популяцию TIL, включающий:

(a) получение и/или прием первой популяции TIL из опухоли, резецированной у субъекта, путем обработки образца опухоли, полученного от указанного субъекта, с получением множества фрагментов опухоли;

(b) отбор положительных по PD-1 TIL из первой популяции TIL из этапа (a) с получением обогащенной по PD-1 популяции TIL;

(c) проведение примирующей первой экспансии путем культивирования указанной обогащенной по PD-1 популяции TIL в среде для культивирования клеток, содержащей IL-2, OKT-3 и антигенпрезентирующие клетки (АПК), с получением второй популяции TIL, где примирующую первую экспансию проводят в контейнере, содержащем первую газопроницаемую площадь поверхности, где примирующую первую экспансию проводят в течение первого периода приблизительно от 1 до 7/8 дней с получением указанной второй популяции TIL, где указанная вторая популяция TIL больше по численности, чем указанная первая популяция TIL;

(d) проведение быстрой второй экспансии путем добавления в среду для культивирования клеток указанной второй популяции TIL добавок IL-2, OKT-3 и АПК с получением третьей популяции TIL, где количество АПК, добавляемое при быстрой второй экспансии, по меньшей мере в два раза больше, чем количество АПК, добавляемое на этапе (b), где быструю вторую экспансию проводят в течение второго периода приблизительно от 1 до 11 дней с получением указанной третьей популяции TIL, где указанная третья популяция TIL представляет собой терапевтическую популяцию TIL, где быструю вторую экспансию проводят в контейнере, содержащем вторую газопроницаемую площадь поверхности;

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

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

[0006] В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен способ экспансии опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов (TIL) в терапевтическую популяцию TIL, включающий:

получение и/или прием первой популяции TIL из опухоли, резецированной у субъекта, путем обработки образца опухоли, полученного от указанного субъекта, с получением множества фрагментов опухоли;

отбор положительных по PD-1 TIL из первой популяции TIL из этапа (a) с получением обогащенной по PD-1 популяции TIL;

проведение примирующей первой экспансии путем культивирования указанной обогащенной по PD-1 популяции TIL в среде для культивирования клеток, содержащей IL-2, OKT-3, и необязательно содержащей антигенпрезентирующие клетки (АПК), с получением второй популяции TIL, где примирующую первую экспансию проводят в течение первого периода приблизительно от 1 до 7/8 дней с получением указанной второй популяции TIL, где указанная вторая популяция TIL больше по численности, чем указанная первая популяция TIL;

проведение быстрой второй экспансии путем приведения указанной второй популяции TIL в контакт со средой для культивирования клеток, содержащей IL-2, OKT-3 и АПК, с получением третьей популяции TIL, где быструю вторую экспансию проводят в течение второго периода приблизительно от 1 до 11 дней с получением указанной третьей популяции TIL, где указанная третья популяция TIL представляет собой терапевтическую популяцию TIL; и

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

[0007] В некоторых вариантах осуществления «получение» означает, что TIL, применяемые в способе и/или процессе, могут быть получены непосредственно из образца (в том числе полученного с помощью хирургической резекции, пункционной биопсии, толстоигольной биопсии, малой биопсии, или другого образца) как части этапов способа и/или процесса. В некоторых вариантах осуществления «прием» означает, что TIL, применяемые в способе и/или процессе, могут быть получены из образца (в том числе полученного с помощью хирургической резекции, пункционной биопсии, толстоигольной биопсии, малой биопсии, или другого образца) опосредованно и затем применены в способе и/или процессе (например, когда этап (a) начинается с TIL, которые уже были выделены из образца с помощью отдельного процесса, не включенного в часть (a), такие TIL могут называться «принятыми»).

[0008] В некоторых вариантах осуществления на этапе (b) среда для культивирования клеток дополнительно содержит антигенпрезентирующие клетки (АПК), где количество АПК в культуральной среде на этапе (c) больше, чем количество АПК в культуральной среде на этапе (b).

[0009] В некоторых вариантах осуществления на этапе (b) среда для культивирования клеток дополнительно содержит антигенпрезентирующие клетки (АПК), где количество АПК в культуральной среде на этапе (c) равно количеству АПК в культуральной среде на этапе (b).

[0010] В некоторых вариантах осуществления положительные по PD-1 TIL представляют собой PD-1high TIL.

[0011] В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен способ экспансии опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов (TIL) в терапевтическую популяцию TIL, включающий:

(a) проведение примирующей первой экспансии путем культивирования первой популяции TIL, которые были отобраны как положительные по PD-1, где указанная первая популяция TIL может быть получена путем обработки образца опухоли от субъекта путем гидролиза опухоли и отбора положительных по PD-1 TIL, в среде для культивирования клеток, содержащей IL-2, OKT-3 и антигенпрезентирующие клетки (АПК), с получением второй популяции TIL, где примирующую первую экспансию проводят в контейнере, содержащем первую газопроницаемую площадь поверхности, где примирующую первую экспансию проводят в течение первого периода приблизительно от 1 до 7/8 дней с получением указанной второй популяции TIL, где указанная вторая популяция TIL больше по численности, чем указанная первая популяция TIL;

(b) проведение быстрой второй экспансии путем приведения указанной второй популяции TIL в контакт со средой для культивирования клеток указанной второй популяции TIL с добавками IL-2, OKT-3 и АПК с получением третьей популяции TIL, где количество АПК при быстрой второй экспансии по меньшей мере в два раза больше, чем количество АПК на этапе (a), где быструю вторую экспансию проводят в течение второго периода приблизительно от 1 до 11 дней с получением указанной третьей популяции TIL, где указанная третья популяция TIL представляет собой терапевтическую популяцию TIL, где быструю вторую экспансию проводят в контейнере, содержащем вторую газопроницаемую площадь поверхности; и

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

[0012] В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен способ экспансии опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов (TIL) в терапевтическую популяцию TIL, включающий:

(a) проведение примирующей первой экспансии TIL, которые были отобраны как положительные по PD-1, путем культивирования первой популяции TIL в среде для культивирования клеток, содержащей IL-2, OKT-3, и необязательно содержащей антигенпрезентирующие клетки (АПК), с получением второй популяции TIL, где примирующую первую экспансию проводят в течение первого периода приблизительно от 1 до 7/8 дней с получением указанной второй популяции TIL, где указанная вторая популяция TIL больше по численности, чем указанная первая популяция TIL;

(b) проведение быстрой второй экспансии путем приведения указанной второй популяции TIL в контакт со средой для культивирования клеток, содержащей IL-2, OKT-3 и АПК, с получением третьей популяции TIL, где быструю вторую экспансию проводят в течение второго периода приблизительно от 1 до 11 дней с получением указанной третьей популяции TIL, где указанная третья популяция TIL представляет собой терапевтическую популяцию TIL; и

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

[0013] В некоторых вариантах осуществления на этапе (b) среда для культивирования клеток дополнительно содержит антигенпрезентирующие клетки (АПК), где количество АПК в культуральной среде на этапе (c) больше, чем количество АПК в культуральной среде на этапе (b).

[0014] В некоторых вариантах осуществления на этапе (b) среда для культивирования клеток дополнительно содержит антигенпрезентирующие клетки (АПК), где количество АПК в культуральной среде на этапе (c) равно количеству АПК в культуральной среде на этапе (b).

[0015] В некоторых вариантах осуществления положительные по PD-1 TIL представляют собой PD-1high TIL.

[0016] В некоторых вариантах осуществления отбор на этапе (b) включает этапы (i) воздействия на первую популяцию TIL избытка моноклонального антитела IgG4 к PD-1, которое связывается с PD-1 через N-концевую петлю за пределами домена IgV PD-1, (ii) добавления избытка антитела к IgG4, конъюгированного с флуорофором, и (iii) проведения проточной сортировки клеток на основе флуорофора с получением обогащенной по PD-1 популяции TIL.

[0017] В некоторых вариантах осуществления моноклональное антитело IgG4 к PD-1 представляет собой ниволумаб или его варианты, фрагменты или конъюгаты. В некоторых вариантах осуществления антитело к IgG4 представляет собой клон к IgG4 человека, клон HP6023.

[0018] В некоторых вариантах осуществления соотношение количества АПК при быстрой второй экспансии и количества АПК при примирующей первой экспансии выбрано из диапазона от приблизительно 1,5:1 до приблизительно 20:1.

[0019] В некоторых вариантах осуществления соотношение выбрано из диапазона от приблизительно 1,5:1 до приблизительно 10:1.

[0020] В некоторых вариантах осуществления соотношение выбрано из диапазона от приблизительно 2:1 до приблизительно 5:1.

[0021] В некоторых вариантах осуществления соотношение выбрано из диапазона от приблизительно 2:1 до приблизительно 3:1.

[0022] В некоторых вариантах осуществления соотношение составляет приблизительно 2:1.

[0023] В некоторых вариантах осуществления количество АПК при примирующей первой экспансии выбрано из диапазона от приблизительно 1×10^8 АПК до приблизительно $3,5\times10^8$ АПК, и количество АПК при быстрой второй экспансии выбрано из диапазона от приблизительно $3,5\times10^8$ АПК до приблизительно 1×10^9 АПК.

[0024] В некоторых вариантах осуществления количество АПК при примирующей первой экспансии выбрано из диапазона от приблизительно $1,5\times10^8$ АПК до приблизительно 3×10^8 АПК, и количество АПК при быстрой второй экспансии выбрано из диапазона от приблизительно 4×10^8 АПК до приблизительно $7,5\times10^8$ АПК.

[0025] В некоторых вариантах осуществления количество АПК при примирующей

первой экспансии выбрано из диапазона от приблизительно 2×10^8 АПК до приблизительно $2,5\times10^8$ АПК, и количество АПК при быстрой второй экспансии выбрано из диапазона от приблизительно $4,5\times10^8$ АПК до приблизительно $5,5\times10^8$ АПК.

[0026] В некоторых вариантах осуществления приблизительно $2,5\times10^8$ АПК добавляют при примирующей первой экспансии и 5×10^8 АПК добавляют при быстрой второй экспансии.

[0027] В некоторых вариантах осуществления соотношение количества TIL в указанной второй популяции TIL и количества TIL в указанной первой популяции TIL составляет от приблизительно 1,5:1 до приблизительно 100:1.

[0028] В некоторых вариантах осуществления соотношение количества TIL в указанной второй популяции TIL и количества TIL в указанной первой популяции TIL составляет приблизительно 50:1.

[0029] В некоторых вариантах осуществления соотношение количества TIL в указанной второй популяции TIL и количества TIL в указанной первой популяции TIL составляет приблизительно 25:1.

[0030] В некоторых вариантах осуществления соотношение количества TIL в указанной второй популяции TIL и количества TIL в указанной первой популяции TIL составляет приблизительно 20:1.

[0031] В некоторых вариантах осуществления соотношение количества TIL в указанной второй популяции TIL и количества TIL в указанной первой популяции TIL составляет приблизительно 10:1.

[0032] В некоторых вариантах осуществления указанная вторая популяция TIL по меньшей мере в 50 раз больше по численности, чем указанная первая популяция TIL.

[0033] В некоторых вариантах осуществления способ включает проведение после этапа сбора терапевтической популяции TIL дополнительного этапа переноса собранной терапевтической популяции TIL в пакет для инфузии.

[0034] В некоторых вариантах осуществления множество фрагментов опухоли распределяют во множество отдельных контейнеров, в каждом из которых получают вторую популяцию TIL из первой популяции TIL на этапе примирующей первой экспансии, и получают третью популяцию TIL из второй популяции TIL на этапе быстрой второй экспансии, и при этом терапевтическую популяцию TIL, полученную из третьей популяции TIL, собирают из каждого из множества контейнеров и объединяют с получением собранной популяции TIL.

[0035] В некоторых вариантах осуществления множество отдельных контейнеров включает по меньшей мере два отдельных контейнера.

[0036] В некоторых вариантах осуществления множество отдельных контейнеров включает от двух до двадцати отдельных контейнеров.

[0037] В некоторых вариантах осуществления множество отдельных контейнеров включает от двух до десяти отдельных контейнеров.

[0038] В некоторых вариантах осуществления множество отдельных контейнеров

включает от двух до пяти отдельных контейнеров.

[0039] В некоторых вариантах осуществления каждый из отдельных контейнеров содержит первую газопроницаемую площадь поверхности.

[0040] В некоторых вариантах осуществления множество фрагментов опухоли распределяют в одном контейнере.

[0041] В некоторых вариантах осуществления один контейнер содержит первую газопроницаемую площадь поверхности.

[0042] В некоторых вариантах осуществления на этапе примирующей первой экспансии среда для культивирования клеток содержит антигенпрезентирующие клетки (АПК), и АПК наслаивают на первую газопроницаемую площадь поверхности со средней толщиной от приблизительно одного клеточного слоя до приблизительно трех клеточных слоев.

[0043] В некоторых вариантах осуществления на этапе примирующей первой экспансии АПК наслаивают на первую газопроницаемую площадь поверхности со средней толщиной от приблизительно 1,5 клеточных слоев до приблизительно 2,5 клеточных слоев.

[0044] В некоторых вариантах осуществления на этапе примирующей первой экспансии АПК наслаивают на первую газопроницаемую площадь поверхности со средней толщиной приблизительно 2 клеточных слоя.

[0045] В некоторых вариантах осуществления на этапе быстрой второй экспансии АПК наслаивают на первую газопроницаемую площадь поверхности с толщиной от приблизительно 3 клеточных слоев до приблизительно 5 клеточных слоев.

[0046] В некоторых вариантах осуществления на этапе быстрой второй экспансии АПК наслаивают на первую газопроницаемую площадь поверхности с толщиной от приблизительно 3,5 клеточных слоев до приблизительно 4,5 клеточных слоев.

[0047] В некоторых вариантах осуществления на этапе быстрой второй экспансии АПК наслаивают на первую газопроницаемую площадь поверхности с толщиной приблизительно 4 клеточных слоя.

[0048] В некоторых вариантах осуществления на этапе примирующей первой экспансии примирующую первую экспансию проводят в первом контейнере, содержащем первую газопроницаемую площадь поверхности, а на этапе быстрой второй экспансии быструю вторую экспансию проводят во втором контейнере, содержащем вторую газопроницаемую площадь поверхности.

[0049] В некоторых вариантах осуществления указанный второй контейнер больше, чем указанный первый контейнер.

[0050] В некоторых вариантах осуществления на этапе примирующей первой экспансии среда для культивирования клеток содержит антигенпрезентирующие клетки (АПК), и АПК наслаивают на первую газопроницаемую площадь поверхности со средней толщиной от приблизительно одного клеточного слоя до приблизительно трех клеточных слоев.

[0051] В некоторых вариантах осуществления на этапе примирующей первой

экспансии АПК наслаивают на первую газопроницаемую площадь поверхности со средней толщиной от приблизительно 1,5 клеточных слоев до приблизительно 2,5 клеточных слоев.

[0052] В некоторых вариантах осуществления на этапе примирующей первой экспансии АПК наслаивают на первую газопроницаемую площадь поверхности со средней толщиной приблизительно 2 клеточных слоя.

[0053] В некоторых вариантах осуществления на этапе быстрой второй экспансии АПК наслаивают на вторую газопроницаемую площадь поверхности со средней толщиной от приблизительно 3 клеточных слоев до приблизительно 5 клеточных слоев.

[0054] В некоторых вариантах осуществления на этапе быстрой второй экспансии АПК наслаивают на вторую газопроницаемую площадь поверхности со средней толщиной от приблизительно 3,5 клеточных слоев до приблизительно 4,5 клеточных слоев.

[0055] В некоторых вариантах осуществления на этапе быстрой второй экспансии АПК наслаивают на вторую газопроницаемую площадь поверхности со средней толщиной приблизительно 4 клеточных слоя.

[0056] В некоторых вариантах осуществления для каждого контейнера, в котором проводят примирующую первую экспансию с первой популяцией TIL, быструю вторую экспансию проводят в том же контейнере со второй популяцией TIL, полученной из такой первой популяции TIL.

[0057] В некоторых вариантах осуществления каждый контейнер содержит первую газопроницаемую площадь поверхности.

[0058] В некоторых вариантах осуществления на этапе примирующей первой экспансии среда для культивирования клеток содержит антигенпрезентирующие клетки (АПК), и АПК наслаивают на первую газопроницаемую площадь поверхности со средней толщиной от приблизительно одного клеточного слоя до приблизительно трех клеточных слоев.

[0059] В некоторых вариантах осуществления на этапе примирующей первой экспансии АПК наслаивают на первую газопроницаемую площадь поверхности со средней толщиной от приблизительно 1,5 клеточных слоев до приблизительно 2,5 клеточных слоев.

[0060] В некоторых вариантах осуществления на этапе примирующей первой экспансии АПК наслаивают на первую газопроницаемую площадь поверхности со средней толщиной приблизительно 2 клеточных слоя.

[0061] В некоторых вариантах осуществления на этапе быстрой второй экспансии АПК наслаивают на первую газопроницаемую площадь поверхности со средней толщиной от приблизительно 3 клеточных слоев до приблизительно 5 клеточных слоев.

[0062] В некоторых вариантах осуществления на этапе быстрой второй экспансии АПК наслаивают на первую газопроницаемую площадь поверхности со средней толщиной от приблизительно 3,5 клеточных слоев до приблизительно 4,5 клеточных слоев.

[0063] В некоторых вариантах осуществления на этапе быстрой второй экспансии АПК наслаивают на первую газопроницаемую площадь поверхности со средней толщиной приблизительно 4 клеточных слоя.

[0064] В некоторых вариантах осуществления для каждого контейнера, в котором проводят примирующую первую экспансию с первой популяцией TIL на этапе примирующей первой экспансии, первый контейнер содержит первую площадь поверхности, среда для культивирования клеток содержит антигенпрезентирующие клетки (АПК), и АПК наслаивают на первую газопроницаемую площадь поверхности, и при этом соотношение среднего количества слоев АПК, наслоенных на этапе примирующей первой экспансии, и среднего количества слоев АПК, наслоенных на этапе быстрой второй экспансии, выбрано из диапазона от приблизительно 1:1,1 до приблизительно 1:10.

[0065] В некоторых вариантах осуществления соотношение среднего количества слоев АПК, наслоенных на этапе примирующей первой экспансии, и среднего количества слоев АПК, наслоенных на этапе быстрой второй экспансии, выбрано из диапазона от приблизительно 1:1,2 до приблизительно 1:8.

[0066] В некоторых вариантах осуществления соотношение среднего количества слоев АПК, наслоенных на этапе примирующей первой экспансии, и среднего количества слоев АПК, наслоенных на этапе быстрой второй экспансии, выбрано из диапазона от приблизительно 1:1,3 до приблизительно 1:7.

[0067] В некоторых вариантах осуществления соотношение среднего количества слоев АПК, наслоенных на этапе примирующей первой экспансии, и среднего количества слоев АПК, наслоенных на этапе быстрой второй экспансии, выбрано из диапазона от приблизительно 1:1,4 до приблизительно 1:6.

[0068] В некоторых вариантах осуществления соотношение среднего количества слоев АПК, наслоенных на этапе примирующей первой экспансии, и среднего количества слоев АПК, наслоенных на этапе быстрой второй экспансии, выбрано из диапазона от приблизительно 1:1,5 до приблизительно 1:5.

[0069] В некоторых вариантах осуществления соотношение среднего количества слоев АПК, наслоенных на этапе примирующей первой экспансии, и среднего количества слоев АПК, наслоенных на этапе быстрой второй экспансии, выбрано из диапазона от приблизительно 1:1,6 до приблизительно 1:4.

[0070] В некоторых вариантах осуществления соотношение среднего количества слоев АПК, наслоенных на этапе примирующей первой экспансии, и среднего количества слоев АПК, наслоенных на этапе быстрой второй экспансии, выбрано из диапазона от приблизительно 1:1,7 до приблизительно 1:3,5.

[0071] В некоторых вариантах осуществления соотношение среднего количества слоев АПК, наслоенных на этапе примирующей первой экспансии, и среднего количества слоев АПК, наслоенных на этапе быстрой второй экспансии, выбрано из диапазона от приблизительно 1:1,8 до приблизительно 1:3.

[0072] В некоторых вариантах осуществления соотношение среднего количества слоев АПК, наслоенных на этапе примирующей первой экспансии, и среднего количества слоев АПК, наслоенных на этапе быстрой второй экспансии, выбрано из диапазона от приблизительно 1:1,9 до приблизительно 1:2,5.

[0073] В некоторых вариантах осуществления соотношение среднего количества слоев АПК, наслоенных на этапе примирующей первой экспансии, и среднего количества слоев АПК, наслоенных на этапе быстрой второй экспансии, составляет приблизительно 1:2.

[0074] В некоторых вариантах осуществления через 2-3 дня на этапе быстрой второй экспансии в среду для культивирования клеток добавляют добавку IL-2.

[0075] В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает криоконсервацию собранной популяции TIL на этапе сбора терапевтической популяции TIL с использованием процесса криоконсервации.

[0076] В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает этап криоконсервации пакета для инфузии.

[0077] В некоторых вариантах осуществления процесс криоконсервации проводят с использованием соотношения собранной популяции TIL и среды для криоконсервации, составляющего 1:1.

[0078] В некоторых вариантах осуществления антигенпрезентирующие клетки представляют собой мононуклеарные клетки периферической крови (МНПК).

[0079] В некоторых вариантах осуществления МНПК являются облученными и аллогенными.

[0080] В некоторых вариантах осуществления на этапе примирующей первой экспансии среда для культивирования клеток содержит мононуклеарные клетки периферической крови (МНПК), и при этом общее количество МНПК в среде для культивирования клеток на этапе примирующей первой экспансии составляет $2,5 \times 10^8$.

[0081] В некоторых вариантах осуществления на этапе быстрой второй экспансии антигенпрезентирующие клетки (АПК) в среде для культивирования клеток представляют собой мононуклеарные клетки периферической крови (МНПК), и при этом общее количество МНПК, добавленных в среду для культивирования клеток на этапе быстрой второй экспансии, составляет 5×10^8.

[0082] В некоторых вариантах осуществления антигенпрезентирующие клетки представляют собой искусственные антигенпрезентирующие клетки.

[0083] В некоторых вариантах осуществления сбор на этапе сбора терапевтической популяции TIL проводят с использованием мембранной системы обработки клеток.

[0084] В некоторых вариантах осуществления сбор на этапе (d) проводят с использованием системы обработки клеток LOVO.

[0085] В некоторых вариантах осуществления множество фрагментов включает приблизительно 60 фрагментов на контейнер на этапе примирующей первой экспансии, где каждый фрагмент имеет объем приблизительно 27 $мм^3$.

[0086] В некоторых вариантах осуществления множество фрагментов включает от приблизительно 30 до приблизительно 60 фрагментов с общим объемом от приблизительно 1300 $мм^3$ до приблизительно 1500 $мм^3$.

[0087] В некоторых вариантах осуществления множество фрагментов включает

приблизительно 50 фрагментов с общим объемом приблизительно 1350 мм^3.

[0088] В некоторых вариантах осуществления множество фрагментов включает приблизительно 50 фрагментов общей массой от приблизительно 1 грамма до приблизительно 1,5 граммов.

[0089] В некоторых вариантах осуществления среда для культивирования клеток предоставлена в контейнере, выбранном из группы, состоящей из G-контейнера и Xuri cellbag.

[0090] В некоторых вариантах осуществления через 2-3 дня на этапе (d) в среду для культивирования клеток добавляют добавку IL-2.

[0091] В некоторых вариантах осуществления концентрация IL-2 составляет от приблизительно 10000 МЕ/мл до приблизительно 5000 МЕ/мл.

[0092] В некоторых вариантах осуществления концентрация IL-2 составляет приблизительно 6000 МЕ/мл.

[0093] В некоторых вариантах осуществления пакет для инфузии на этапе переноса собранной терапевтической популяции TIL в пакет для инфузии представляет собой пакет для инфузии, содержащий HypoThermosol.

[0094] В некоторых вариантах осуществления среда для криоконсервации содержит диметилсульфоксид (ДМСО).

[0095] В некоторых вариантах осуществления среда для криоконсервации содержит от 7% до 10% ДМСО.

[0096] В некоторых вариантах осуществления первый период на этапе примирующей первой экспансии и второй период на этапе быстрой второй экспансии каждый в отдельности проводят в течение периода 5 дней, 6 дней, 7 дней, 8 дней, 9 дней, 10 дней или 11 дней.

[0097] В некоторых вариантах осуществления первый период на этапе примирующей первой экспансии проводят в течение периода 5 дней, 6 дней или 7 дней.

[0098] В некоторых вариантах осуществления второй период на этапе быстрой второй экспансии проводят в течение периода 7 дней, 8 дней или 9 дней.

[0099] В некоторых вариантах осуществления первый период на этапе примирующей первой экспансии и второй период на этапе быстрой второй экспансии каждый в отдельности проводят в течение периода 7 дней.

[00100] В некоторых вариантах осуществления этапы от примирующей первой экспансии до сбора терапевтической популяции TIL проводят в течение периода от приблизительно 14 дней до приблизительно 16 дней.

[00101] В некоторых вариантах осуществления этапы от примирующей первой экспансии до сбора терапевтической популяции TIL проводят в течение периода от приблизительно 15 дней до приблизительно 16 дней.

[00102] В некоторых вариантах осуществления этапы от примирующей первой экспансии до сбора терапевтической популяции TIL проводят в течение периода приблизительно 14 дней.

[00103] В некоторых вариантах осуществления этапы от примирующей первой экспансии до сбора терапевтической популяции TIL проводят в течение периода приблизительно 15 дней.

[00104] В некоторых вариантах осуществления этапы от примирующей первой экспансии до сбора терапевтической популяции TIL проводят в течение периода приблизительно 16 дней.

[00105] В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает этап криоконсервации собранной терапевтической популяции TIL с использованием процесса криоконсервации, где этапы от примирующей первой экспансии до сбора терапевтической популяции TIL и криоконсервации проводят за 16 дней или менее.

[00106] В некоторых вариантах осуществления терапевтическая популяция TIL, собранная на этапе сбора терапевтической популяции TIL, содержит достаточное количество TIL для терапевтически эффективной дозировки TIL.

[00107] В некоторых вариантах осуществления количество TIL, достаточное для терапевтически эффективной дозировки, составляет от приблизительно $2,3\times10^{10}$ до приблизительно $13,7\times10^{10}$.

[00108] В некоторых вариантах осуществления третья популяция TIL на этапе быстрой второй экспансии обеспечивает повышенную эффективность, повышенную продукцию интерферона-гамма и/или повышенную поликлональность.

[00109] В некоторых вариантах осуществления третья популяция TIL на этапе быстрой второй экспансии обеспечивает по меньшей мере в 1-5 или более раз более высокую продукцию интерферона-гамма по сравнению с TIL, полученными с помощью процесса, длящегося более 16 дней.

[00110] В некоторых вариантах осуществления эффекторные Т-клетки и/или Т-клетки центральной памяти, полученные из третьей популяции TIL на этапе быстрой второй экспансии, демонстрируют повышенную экспрессию CD8 и CD28 по сравнению с эффекторными Т-клетками и/или Т-клетками центральной памяти, полученными из второй популяции TIL на этапе примирующей первой экспансии.

[00111] В некоторых вариантах осуществления терапевтическую популяцию TIL с этапа сбора терапевтической популяции TIL вводят пациенту путем инфузии.

[00112] В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает этап криоконсервации пакета для инфузии, содержащего собранную популяцию TIL, с этапа (f) с использованием процесса криоконсервации.

[00113] В некоторых вариантах осуществления процесс криоконсервации проводят с использованием соотношения собранной популяции TIL и среды для криоконсервации, составляющего 1:1.

[00114] В некоторых вариантах осуществления антигенпрезентирующие клетки представляют собой мононуклеарные клетки периферической крови (МНПК).

[00115] В некоторых вариантах осуществления МНПК являются облученными и аллогенными.

[00116] В некоторых вариантах осуществления антигенпрезентирующие клетки представляют собой искусственные антигенпрезентирующие клетки.

[00117] В некоторых вариантах осуществления сбор на этапе (e) проводят с использованием мембранной системы обработки клеток.

[00118] В некоторых вариантах осуществления сбор на этапе (e) проводят с использованием системы обработки клеток LOVO.

[00119] В некоторых вариантах осуществления множество фрагментов включает приблизительно 60 фрагментов на первую газопроницаемую площадь поверхности на этапе (c), где каждый фрагмент имеет объем приблизительно 27 $мм^3$.

[00120] В некоторых вариантах осуществления множество фрагментов включает от приблизительно 30 до приблизительно 60 фрагментов с общим объемом от приблизительно 1300 $мм^3$ до приблизительно 1500 $мм^3$.

[00121] В некоторых вариантах осуществления множество фрагментов включает приблизительно 50 фрагментов с общим объемом приблизительно 1350 $мм^3$.

[00122] В некоторых вариантах осуществления множество фрагментов включает приблизительно 50 фрагментов с общей массой от приблизительно 1 грамма до приблизительно 1,5 граммов.

[00123] В некоторых вариантах осуществления среда для культивирования клеток предоставлена в контейнере, выбранном из группы, состоящей из G-контейнера и Xuri cellbag.

[00124] В некоторых вариантах осуществления концентрация IL-2 составляет от приблизительно 10000 МЕ/мл до приблизительно 5000 МЕ/мл.

[00125] В некоторых вариантах осуществления концентрация IL-2 составляет приблизительно 6000 МЕ/мл.

[00126] В некоторых вариантах осуществления пакет для инфузии на этапе (d) представляет собой пакет для инфузии, содержащий HypoThermosol.

[00127] В некоторых вариантах осуществления среда для криоконсервации содержит диметилсульфоксид (ДМСО).

[00128] В некоторых вариантах осуществления среда для криоконсервации содержит от 7% до 10% ДМСО.

[00129] В некоторых вариантах осуществления первый период на этапе (c) и второй период на этапе (c) каждый в отдельности проводят в течение периода 5 дней, 6 дней или 7 дней.

[00130] В некоторых вариантах осуществления первый период на этапе (c) проводят в течение периода 5 дней, 6 дней или 7 дней.

[00131] В некоторых вариантах осуществления второй период на этапе (c) проводят в течение периода 7 дней, 8 дней или 9 дней.

[00132] В некоторых вариантах осуществления первый период на этапе (c) и второй период на этапе (c) каждый в отдельности проводят в течение периода 7 дней.

[00133] В некоторых вариантах осуществления этапы (a) - (f) проводят в течение

периода от приблизительно 14 дней до приблизительно 16 дней.

[00134] В некоторых вариантах осуществления этапы (a) - (f) проводят в течение периода от приблизительно 15 дней до приблизительно 16 дней.

[00135] В некоторых вариантах осуществления этапы (a) - (f) проводят в течение периода приблизительно 14 дней.

[00136] В некоторых вариантах осуществления этапы (a) - (f) проводят в течение периода приблизительно 15 дней.

[00137] В некоторых вариантах осуществления этапы (a) - (f) проводят в течение периода приблизительно 16 дней.

[00138] В некоторых вариантах осуществления этапы (a) - (f) и криоконсервацию проводят за 16 дней или менее.

[00139] В некоторых вариантах осуществления терапевтическая популяция TIL, собранная на этапе (f), содержит достаточное количество TIL для терапевтически эффективной дозировки TIL.

[00140] В некоторых вариантах осуществления количество TIL, достаточное для терапевтически эффективной дозировки, составляет от приблизительно $2,3\times10^{10}$ до приблизительно $13,7\times10^{10}$.

[00141] В некоторых вариантах осуществления контейнер на этапе (c) больше, чем контейнер на этапе (b).

[00142] В некоторых вариантах осуществления третья популяция TIL на этапе (d) обеспечивает повышенную эффективность, повышенную продукцию интерферона-гамма и/или повышенную поликлональность.

[00143] В некоторых вариантах осуществления третья популяция TIL на этапе (d) обеспечивает по меньшей мере в 1-5 или более раз более высокую продукцию интерферона-гамма по сравнению с TIL, полученными с помощью процесса, длящегося более 16 дней.

[00144] В некоторых вариантах осуществления изобретения эффекторные Т-клетки и/или Т-клетки центральной памяти, полученные из третьей популяции TIL с этапа (d), демонстрируют повышенную экспрессию CD8 и CD28 относительно эффекторных Т-клеток и/или Т-клеток центральной памяти, полученных из второй популяции клеток с этапа (c).

[00145] В некоторых вариантах осуществления TIL с этапа (f) вводят пациенту путем инфузии.

[00146] В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен способ лечения субъекта, имеющего рак, включающий введение подвергнутых экспансии опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов (TIL), включая:

(a) получение и/или прием первой популяции TIL из опухоли, резецированной у субъекта, путем обработки образца опухоли, полученного от указанного субъекта, с получением множества фрагментов опухоли;

(b) отбор положительных по PD-1 TIL из первой популяции TIL из этапа (a) с получением обогащенной по PD-1 популяции TIL;

(c) проведение примирующей первой экспансии путем культивирования указанной обогащенной по PD-1 популяции TIL в среде для культивирования клеток, содержащей IL-2, OKT-3 и антигенпрезентирующие клетки (АПК), с получением второй популяции TIL, где примирующую первую экспансию проводят в контейнере, содержащем первую газопроницаемую площадь поверхности, где примирующую первую экспансию проводят в течение приблизительно от 1 до 7 дней с получением указанной второй популяции TIL, где указанная вторая популяция TIL по меньшей мере в 50 раз больше по численности, чем указанная первая популяция TIL;

(d) проведение быстрой второй экспансии путем добавления в среду для культивирования клеток указанной второй популяции TIL добавок IL-2, OKT-3 и АПК с получением третьей популяции TIL, где количество АПК, добавляемое при быстрой второй экспансии, по меньшей мере в два раза больше, чем количество АПК, добавляемое на этапе (b), где быструю вторую экспансию проводят в течение приблизительно от 1 до 11 дней с получением указанной третьей популяции TIL, где указанная третья популяция TIL представляет собой терапевтическую популяцию TIL, где быструю вторую экспансию проводят в контейнере, содержащем вторую газопроницаемую площадь поверхности;

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

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

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

[00147] В некоторых вариантах осуществления количество TIL, достаточное для введения терапевтически эффективной дозировки на этапе (g), составляет от приблизительно $2,3\times10^{10}$ до приблизительно $13,7\times10^{10}$.

[00148] В некоторых вариантах осуществления положительные по PD-1 TIL представляют собой PD-1high TIL.

[00149] В некоторых вариантах осуществления отбор на этапе (b) включает этапы (i) воздействия на первую популяцию TIL избытка моноклонального антитела IgG4 к PD-1, которое связывается с PD-1 через N-концевую петлю за пределами домена IgV PD-1, (ii) добавления избытка антитела к IgG4, конъюгированного с флуорофором, и (iii) проведения проточной сортировки клеток на основе флуорофора с получением обогащенной по PD-1 популяции TIL.

[00150] В некоторых вариантах осуществления моноклональное антитело IgG4 к PD-1 представляет собой ниволумаб или его варианты, фрагменты или конъюгаты.

[00151] В некоторых вариантах осуществления антитело к IgG4 представляет собой клон к IgG4 человека, клон HP6023.

[00152] В некоторых вариантах осуществления антигенпрезентирующие клетки (АПК) представляют собой МНПК.

[00153] В некоторых вариантах осуществления до введения терапевтически эффективной дозировки TIL-клеток на этапе (g) пациенту вводили режим немиелоаблативной лимфодеплеции.

[00154] В некоторых вариантах осуществления режим немиелоаблативной лимфодеплеции включает этапы введения циклофосфамида в дозе 60 мг/м^2/сут в течение двух дней с последующим введением флударабина в дозе 25 мг/м^2/сут в течение пяти дней.

[00155] В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает этап лечения пациента с использованием высокодозового режима IL-2, начиная со следующего дня после введения пациенту TIL-клеток на этапе (g).

[00156] В некоторых вариантах осуществления высокодозовый режим IL-2 включает 600000 или 720000 МЕ/кг, вводимых в виде 15-минутной внутривенной болюсной инфузии каждые восемь часов до достижения толерантности.

[00157] В некоторых вариантах осуществления третья популяция TIL на этапе (c) обеспечивает повышенную эффективность, повышенную продукцию интерферона-гамма и/или повышенную поликлональность.

[00158] В некоторых вариантах осуществления третья популяция TIL на этапе (d) обеспечивает по меньшей мере в 1-5 или более раз более высокую продукцию интерферона-гамма по сравнению с TIL, полученными с помощью процесса, длящегося более 16 дней.

[00159] В некоторых вариантах осуществления изобретения эффекторные Т-клетки и/или Т-клетки центральной памяти, полученные из третьей популяции TIL с этапа (d), демонстрируют повышенную экспрессию CD8 и CD28 относительно эффекторных Т-клеток и/или Т-клеток центральной памяти, полученных из второй популяции клеток с этапа (c).

[00160] В некоторых вариантах осуществления рак выбран из группы, состоящей из меланомы, рака яичника, рака шейки матки, немелкоклеточного рака легкого (НМРЛ), рака легкого, рака мочевого пузыря, рака молочной железы, рака, вызванного вирусом папилломы человека, рака головы и шеи (включая плоскоклеточную карциному головы и шеи (ПКГШ)), глиобластомы (включая GBM), рака желудочно-кишечного тракта, рака почки и почечно-клеточной карциномы.

[00161] В некоторых вариантах осуществления рак выбран из группы, состоящей из меланомы, ПКГШ, рака шейки матки, НМРЛ, глиобластомы (включая GBM) и рака желудочно-кишечного тракта.

[00162] В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой меланому.

[00163] В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой ПКГШ.

[00164] В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой рак шейки матки.

[00165] В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой НМРЛ.

[00166] В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой глиобластому (включая GBM).

[00167] В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой рак желудочно-кишечного тракта.

[00168] В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой гипермутированный рак.

[00169] В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой гипермутированный рак у детей.

[00170] В некоторых вариантах осуществления контейнер представляет собой GREX-10.

[00171] В некоторых вариантах осуществления закрытый контейнер включает GREX-100.

[00172] В некоторых вариантах осуществления закрытый контейнер включает GREX-500.

[00173] В некоторых вариантах осуществления субъект ранее получал лечение антителом к PD-1.

[00174] В некоторых вариантах осуществления субъект ранее не получал лечение антителом к PD-1.

[00175] В некоторых вариантах осуществления на этапе (b) положительные по PD-1 TIL выбирают из первой популяции TIL путем проведения этапа приведения первой популяции TIL в контакт с антителом к PD-1 с образованием первого комплекса антитела к PD-1 и TIL-клеток в первой популяции TIL, а затем проведения этапа выделения первого комплекса с получением обогащенной по PD-1 популяции TIL.

[00176] В некоторых вариантах осуществления антитело к PD-1 содержит Fc-область, где после этапа образования первых комплексов и перед этапом выделения первого комплекса способ дополнительно включает этап приведения первого комплекса в контакт с антителом к Fc, которое связывается с Fc-областью антитела к PD-1 с образованием второго комплекса антитела к Fc и первого комплекса, и где этап выделения первого комплекса проводят путем выделения второго комплекса.

[00177] В некоторых вариантах осуществления антитело к PD-1 для применения в отборе на этапе (b) выбрано из группы, состоящей из EH12.2H7, PD1.3.1, M1H4, ниволумаба (BMS-936558, Bristol-Myers Squibb; Opdivo®), пембролизумаба (ламбролизумаб, MK03475 или MK-3475, Merck; Keytruda®), H12.1, PD1.3.1, NAT 105, гуманизированного антитела к PD-1 JS001 (ShangHai JunShi), моноклонального антитела к PD-1 TSR-042 (Tesaro, Inc.), пидилизумаба (mAb к PD-1 CT-011, Medivation), моноклонального антитела к PD-1 BGB-A317 (BeiGene) и/или антитела к PD-1 SHR-1210 (ShangHai HengRui), моноклонального антитела REGN2810 человека (Regeneron), моноклонального антитела MDX-1106 человека (Bristol-Myers Squibb), гуманизированного антитела IgG4 к PD-1 PDR001 (Novartis) и RMP1-14 (крысиный IgG) - BioXcell, № по каталогу BP0146.

[00178] В некоторых вариантах осуществления антитело к PD-1 для применения в отборе представляет собой EH12.2H7.

[00179] В некоторых вариантах осуществления антитело к PD-1 для применения в отборе на этапе (b) связывается с эпитопом, отличным от эпитопа, с которым связывается ниволумаб или пембролизумаб.

[00180] В некоторых вариантах осуществления антитело к PD-1 для применения в

отборе на этапе (b) связывается с тем же эпитопом, что и EH12.2H7 или ниволумаб.

[00181] В некоторых вариантах осуществления антитело к PD-1 для применения в отборе на этапе (b) представляет собой ниволумаб.

[00182] В некоторых вариантах осуществления субъект ранее получал лечение первым антителом к PD-1, где на этапе (b) положительные по PD-1 TIL отбирают путем приведения первой популяции TIL в контакт со вторым антителом к PD-1, и где связывание второго антитела к PD-1 с первой популяцией TIL не блокируется первым антителом к PD-1, переведенным в нерастворимую форму на первой популяции TIL.

[00183] В некоторых вариантах осуществления субъект ранее получал лечение первым антителом к PD-1, где на этапе (b) положительные по PD-1 TIL отбирают путем приведения первой популяции TIL в контакт со вторым антителом к PD-1, и где связывание второго антитела к PD-1 с первой популяцией TIL блокируется первым антителом к PD-1, переведенным в нерастворимую форму на первой популяции TIL.

[00184] В некоторых вариантах осуществления субъект ранее получал лечение первым антителом к PD1, где на этапе (b) положительные по PD-1 TIL отбирают путем проведения этапа приведения первой популяции TIL в контакт со вторым антителом к PD-1 с образованием первого комплекса второго антитела к PD-1 и первой популяции TIL, где связывание второго антитела к PD-1 с первой популяцией TIL не блокируется первым антителом к PD-1, переведенным в нерастворимую форму на первой популяции TIL, и затем проведения этапа выделения первого комплекса с получением обогащенной по PD-1 популяции TIL.

[00185] В некоторых вариантах осуществления первое антитело к PD-1 и второе антитело к PD-1 содержат Fc-область, где после этапа образования первого комплекса и перед этапом выделения первого комплекса способ дополнительно включает этап приведения первого комплекса в контакт с антителом к Fc, которое связывается с Fc-областью первого антитела к PD-1 и Fc-областью второго антитела к PD-1 с образованием второго комплекса антитела к Fc и первого комплекса, и где этап выделения первого комплекса проводят путем выделения второго комплекса.

[00186] В некоторых вариантах осуществления второе антитело к PD-1 содержит Fc-область, субъект ранее получал лечение первым антителом к PD1, где на этапе (b) положительные по PD-1 TIL отбирают путем проведения этапа приведения первой популяции TIL в контакт со вторым антителом к PD-1 с образованием первого комплекса второго антитела к PD-1 и первой популяции TIL, где связывание второго антитела к PD-1 с первой популяцией TIL не блокируется первым антителом к PD-1, переведенным в нерастворимую форму на первой популяции TIL, и где после этапа образования первого комплекса способ дополнительно включает этап приведения первого комплекса в контакт с антителом к Fc, которое связывается с Fc-областью второго антитела к PD-1 с образованием второго комплекса антитела к Fc и первого комплекса, и затем проведения этапа выделения второго комплекса с получением обогащенной по PD-1 популяции TIL.

[00187] В некоторых вариантах осуществления субъект ранее получал лечение

первым антителом к PD1, где на этапе (b) положительные по PD-1 TIL отбирают путем проведения этапа приведения первой популяции TIL в контакт со вторым антителом к PD-1 с образованием первого комплекса второго антитела к PD-1 и первой популяции TIL, где связывание второго антитела к PD-1 с положительными по PD-1 TIL блокируется первым антителом к PD-1, переведенным в нерастворимую форму на первой популяции TIL, где первое антитело к PD-1 и второе антитело к PD-1 содержат Fc-область, где после этапа образования первого комплекса и перед этапом получения обогащенной по PD-1 популяции TIL способ дополнительно включает этап приведения первого комплекса в контакт с антителом к Fc, которое связывается с Fc-областью второго антитела к PD-1 с образованием второго комплекса антитела к Fc и первого комплекса, и приведения первого антитела к PD-1, переведенного в нерастворимую форму на первой популяции TIL, в контакт с антителом к Fc с образованием третьего комплекса антитела к Fc и первого антитела к PD-1, переведенного в нерастворимую форму на первой популяции TIL, и проведения этапа выделения второго и третьего комплексов с получением обогащенной по PD-1 популяции TIL.

[00188] В некоторых вариантах осуществления положительные по PD-1 TIL представляют собой PD-1high TIL.

[00189] В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложена терапевтическая популяция опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов (TIL), полученная из положительных по PD-1 клеток, отобранных из опухолевой ткани пациента, где терапевтическая популяция TIL обеспечивает повышенную эффективность и/или повышенную продукцию интерферона-гамма.

[00190] В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложена терапевтическая популяция опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов (TIL), полученная из положительных по PD-1 клеток, отобранных из опухолевой ткани пациента, где терапевтическая популяция TIL обеспечивает повышенную эффективность и/или повышенную продукцию интерферона-гамма.

[00191] В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложена терапевтическая популяция опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов (TIL), полученная из положительных по PD-1 клеток, отобранных из опухолевой ткани пациента, где терапевтическая популяция TIL обеспечивает повышенную продукцию интерферона-гамма.

[00192] В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложена терапевтическая популяция опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов (TIL), полученная из положительных по PD-1 клеток, отобранных из опухолевой ткани пациента, где терапевтическая популяция TIL обеспечивает повышенную эффективность.

[00193] В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложена терапевтическая популяция опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов (TIL), полученная из положительных по PD-1 клеток, отобранных из опухолевой ткани пациента, где терапевтическая популяция TIL способна обеспечивать по меньшей мере в один раз

более высокую продукцию интерферона-гамма по сравнению с TIL, полученными с помощью процесса, длящегося более 16 дней.

[00194] В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложена терапевтическая популяция опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов (TIL), полученная из положительных по PD-1 клеток, отобранных из опухолевой ткани пациента, где терапевтическая популяция TIL способна обеспечивать по меньшей мере в один раз более высокую продукцию интерферона-гамма по сравнению с TIL, полученными с помощью процесса, длящегося более 16-22 дней.

[00195] В некоторых вариантах осуществления отбор положительных по PD-1 TIL из первой популяции TIL с получением обогащенной по PD-1 популяции TIL включает отбор популяции TIL из первой популяции TIL, которая содержит по меньшей мере от 11,27% до 74,4% положительных по PD-1 TIL.

[00196] В некоторых вариантах осуществления этап отбора включает следующие этапы:

(i) воздействия на первую популяцию TIL и популяцию МНПК избытка моноклонального антитела IgG4 к PD-1, которое связывается с PD-1 через N-концевую петлю за пределами домена IgV PD-1,

(ii) добавления избытка антитела к IgG4, конъюгированного с флуорофором,

(iii) получения обогащенной по PD-1 популяции TIL на основе интенсивности флуорофора положительных по PD-1 TIL в первой популяции TIL по сравнению с интенсивностью в популяции МНПК, оцениваемых с помощью сортировки клеток с активированной флуоресценцией (FACS).

[00197] В некоторых вариантах осуществления интенсивность флуорофора как в первой популяции, так и в популяции МНПК используют для настройки гейтов FACS для установления низкого, среднего и высокого уровней интенсивности, которые соответствуют отрицательным по PD-1 TIL, промежуточным по PD-1 TIL и положительным по PD-1 TIL, соответственно.

[00198] В некоторых вариантах осуществления гейты FACS настраивают после этапа (a).

[00199] В некоторых вариантах осуществления положительные по PD-1 TIL представляют собой PD-1high TIL.

[00200] В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 80% обогащенной по PD-1 популяции TIL представляют собой положительные по PD-1 TIL.

[00201] В настоящем изобретении также предложен способ экспансии опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов (TIL) в терапевтическую популяцию TIL, включающий:

(a) получение и/или прием первой популяции TIL из опухоли, резецированной у субъекта, путем обработки образца опухоли, полученного от указанного субъекта, с получением множества фрагментов опухоли;

(b) отбор положительных по PD-1 TIL из первой популяции TIL из этапа (a) с получением обогащенной по PD-1 популяции TIL, где по меньшей мере от 10% до 80%

первой популяции TIL представляют собой положительные по PD-1 TIL;

(c) проведение примирующей первой экспансии путем культивирования указанной обогащенной по PD-1 популяции TIL в среде для культивирования клеток, содержащей IL-2, OKT-3 и антигенпрезентирующие клетки (АПК), с получением второй популяции TIL, где примирующую первую экспансию проводят в контейнере, содержащем первую газопроницаемую площадь поверхности, где примирующую первую экспансию проводят в течение первого периода приблизительно от 1 до 7/8 дней с получением указанной второй популяции TIL, где указанная вторая популяция TIL больше по численности, чем указанная первая популяция TIL;

(d) проведение быстрой второй экспансии путем добавления в среду для культивирования клеток указанной второй популяции TIL добавок IL-2, OKT-3 и АПК с получением третьей популяции TIL, где количество АПК, добавляемое при быстрой второй экспансии, по меньшей мере в два раза больше, чем количество АПК, добавляемое на этапе (b), где быструю вторую экспансию проводят в течение второго периода приблизительно от 1 до 11 дней с получением указанной третьей популяции TIL, где указанная третья популяция TIL представляет собой терапевтическую популяцию TIL, где быструю вторую экспансию проводят в контейнере, содержащем вторую газопроницаемую площадь поверхности;

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

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

[00202] В некоторых вариантах осуществления отбор на этапе (b) включает следующие этапы:

(i) воздействия на первую популяцию TIL и популяцию МНПК избытка моноклонального антитела IgG4 к PD-1, которое связывается с PD-1 через N-концевую петлю за пределами домена IgV PD-1,

(ii) добавления избытка антитела к IgG4, конъюгированного с флуорофором,

(iii) получения обогащенной по PD-1 популяции TIL на основе интенсивности флуорофора положительных по PD-1 TIL в первой популяции TIL по сравнению с интенсивностью в популяции МНПК, оцениваемых с помощью сортировки клеток с активированной флуоресценцией (FACS).

[00203] В некоторых вариантах осуществления интенсивность флуорофора как в первой популяции, так и в популяции МНПК используют для настройки гейтов FACS для установления низкого, среднего и высокого уровней интенсивности, которые соответствуют отрицательным по PD-1 TIL, промежуточным по PD-1 TIL и положительным по PD-1 TIL, соответственно.

[00204] В некоторых вариантах осуществления гейты FACS настраивают после этапа (a).

[00205] В некоторых вариантах осуществления положительные по PD-1 TIL представляют собой PD-1high TIL.

[00206] В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 80% обогащенной

по PD-1 популяции TIL представляют собой положительные по PD-1 TIL.

[00207] В некоторых вариантах осуществления третья популяция TIL содержит по меньшей мере приблизительно 1×10^8 TIL в контейнере.

[00208] В некоторых вариантах осуществления третья популяция TIL содержит по меньшей мере приблизительно 1×10^9 TIL в контейнере.

[00209] В некоторых вариантах осуществления количество обогащенных по PD-1 TIL в примирующей первой экспансии составляет от приблизительно 1×10^4 до приблизительно 1×10^6.

[00210] В некоторых вариантах осуществления количество обогащенных по PD-1 TIL в примирующей первой экспансии составляет от приблизительно 5×10^4 до приблизительно 1×10^6.

[00211] В некоторых вариантах осуществления количество обогащенных по PD-1 TIL в примирующей первой экспансии составляет от приблизительно 2×10^5 до приблизительно 1×10^6.

[00212] В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает этап криоконсервации первой популяции TIL из опухоли, резецированной у субъекта, перед проведением этапа (a).

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

[00213] **Фиг. 1A-1B: A)** показано сравнение между процессом 2A (приблизительно 22-дневный процесс) и вариантом осуществления процесса Gen 3 для производства TIL (процесс продолжительностью приблизительно от 14 до 16 дней). **B)** иллюстративная диаграмма процесса PD-1 Gen3, где приведен обзор этапов с A по F (процесс продолжительностью приблизительно от 14 до 16 дней). **C)** диаграмма, на которой представлены три иллюстративных процесса Gen 3 с обзором этапов с A по F (процесс продолжительностью приблизительно от 14 до 16 дней) для каждого из трех вариантов процесса.

[00214] **Фиг. 2:** Представлена экспериментальная блок-схема для сравнения GEN 2 (процесс 2A) и PD-1 GEN 3.

[00215] **Фиг. 3A-3C: A)** L4054 - фенотипическая характеристика продукта TIL в процессе Gen 2 и Gen 3. **B)** L4055 - фенотипическая характеристика продукта TIL в процессе Gen 2 и Gen 3. **C)** M1085T - фенотипическая характеристика продукта TIL в процессе Gen 2 и Gen 3.

[00216] **Фиг. 4A-4C: A)** L4054 - анализ маркеров памяти на продукте TIL из процессов Gen 2 и Gen 3. **B)** L4055 - анализ маркеров памяти на продукте TIL из процессов Gen 2 и Gen 3. **C)** M1085T - анализ маркеров памяти на продукте TIL из процессов Gen 2 и Gen 3.

[00217] **Фиг. 5:** L4054 - маркеры активации и истощения **(A)** с гейтированием по CD4+, **(B)** с гейтированием по CD8+.

[00218] **Фиг. 6:** L4055 - маркеры активации и истощения **(A)** с гейтированием по CD4+, **(B)** с гейтированием по CD8+.

[00219] **Фиг. 7:** Продукция IFNγ (пг/мл): (A) L4054, (B) L4055 и (C) M1085T для процессов Gen 2 и Gen 3: каждый столбик, представленный на графике, представляет собой среднее значение+SEM (стандартная ошибка среднего) для уровней IFNγ стимулированного, нестимулированного и контроля средой. Оптическая плотность измерена при 450 нм.

[00220] **Фиг. 8:** Анализ методом ELISA концентрации IL-2 в супернатанте клеточной культуры: **(A) L4054** и **(B) L4055**. Каждый столбик, представленный на графике, представляет собой среднее значение+SEM для уровней IL-2 в отработанной среде. Оптическая плотность измерена при 450 нм.

[00221] **Фиг. 9:** Количественное определение глюкозы и лактата (г/л) в отработанной среде: (A) глюкоза и (B) лактат: в двух линиях опухолей и в обоих процессах снижение уровня глюкозы наблюдалось на протяжении всей экспансии REP. И наоборот, как и ожидалось, наблюдалось повышение лактата. Как снижение уровня глюкозы, так и повышение уровня лактата были сопоставимы для процессов Gen 2 и Gen 3.

[00222] **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.

[00223] **Фиг. 11: Анализ длины теломер:** приведенное выше значение RTL означает среднюю флуоресценцию теломер на хромосому/геном в процессе Gen 2 и Gen 3 по сравнению с флуоресценцией теломер на хромосому/геном в контрольной клеточной линии (линия клеток лейкоза 1301) с использованием набора DAKO.

[00224] **Фиг. 12:** Анализ уникальных последовательностей CDR3 для готового продукта TIL на L4054 и L4055 в процессе Gen 2 и Gen 3. Столбцы показывают количество уникальных клонотипов TCR B, идентифицированных из 1×10^6 клеток, собранных в день сбора 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.

[00225] **Фиг. 13:** Частота уникальных последовательностей CDR3 в собранном готовом продукте TIL-клеток из L4054 (процесс Gen 2 (например, день 22) и Gen 3 (например, день 14-16)).

[00226] **Фиг. 14:** Частота уникальных последовательностей CDR3 в собранном готовом продукте TIL-клеток из L4055 (процесс Gen 2 (например, день 22) и Gen 3 (например, день 14-16)).

[00227] **Фиг. 15:** Индекс разнообразия для готового продукта TIL из L4054 и L4055 в процессе Gen 2 и Gen 3. Энтропийный индекс разнообразия Шеннона является более надежным и распространенным показателем для сравнения. L4054 и L4055 из Gen 3 продемонстрировали немного большее разнообразие, чем из Gen 2.

[00228] **Фиг. 16:** Необработанные данные для количеств клеток для инициации REP в день 7 Gen 3, представленных в таблице 22 (см. пример 5 ниже).

[00229] **Фиг. 17:** Необработанные данные для количеств клеток для инициации REP в день 11 Gen 2 и масштабирования в Gen 3, представленных в таблице 22 (см. пример 5 ниже).

[00230] **Фиг. 18:** Необработанные данные для количеств клеток для масштабирования в день 16 Gen 2 и сбора в Gen 3 (например, день 16), представленных в таблице 23 (см. пример 5 ниже).

[00231] **Фиг. 19:** Необработанные данные для количеств клеток для сбора в день 22 Gen 2 (например, день 22), представленных в таблице 23 (см. пример 5 ниже). Для L4054 Gen 2 подсчет после LOVO был экстраполирован на 4 колбы, потому что было общее количество в исследовании. 1 колба была загрязнена, и экстраполяция была сделана для в общей сложности=6,67E+10.

[00232] **Фиг. 20:** Необработанные данные для результатов проточной цитометрии, представленных на фиг. 3A, 4A и 4B.

[00233] **Фиг. 21:** Исходные данные для результатов проточной цитометрии, представленных на фиг. 3C и 4C.

[00234] **Фиг. 22:** Необработанные данные для результатов проточной цитометрии, представленных на фиг. 5 и 6.

[00235] **Фиг. 23:** Необработанные данные для результатов анализа продукции IFNγ для образцов L4054, представленных на фиг. 7.

[00236] **Фиг. 24:** Необработанные данные для результатов анализа продукции IFNγ для образцов L4055, представленных на фиг. 7.

[00237] **Фиг. 25:** Необработанные данные для результатов анализа продукции IFNγ для образцов M1085T, представленных на фиг. 7.

[00238] **Фиг. 26:** Необработанные данные для результатов анализа IL-2 методом ELISA, представленных на фиг. 8.

[00239] **Фиг. 27:** Необработанные данные для результатов анализа метаболического субстрата и метаболитов, представленных на фиг. 9 и 10.

[00240] **Фиг. 28:** Необработанные данные для результатов анализа относительной длины теломер, представленных на фиг. 11.

[00241] **Фиг. 29:** Необработанные данные для результатов анализов уникальных последовательностей CD3 и клонального разнообразия, представленных на фиг. 12 и 15.

[00242] **Фиг. 30:** Демонстрирует сравнение различных вариантов осуществления процесса Gen 2 (процесс 2A) и Gen 3.1.

[00243] **Фиг. 31:** Таблица, описывающая различные характеристики вариантов осуществления процесса Gen 2, Gen 2.1 и Gen 3.0.

[00244] **Фиг. 32:** Обзор условий в отношении среды для варианта осуществления процесса Gen 3, называемого Gen 3.1.

[00245] **Фиг. 33:** Таблица, описывающая различные характеристики вариантов осуществления процесса Gen 2, Gen 2.1 и Gen 3.0.

[00246] **Фиг. 34:** Таблица, сравнивающая различные характеристики вариантов

осуществления процессов Gen 2 и Gen 3.0.

[00247] **Фиг. 35:** Таблица с указанием сред, используемых в различных вариантах осуществления описанных процессов экспансии.

[00248] **Фиг. 36:** Сравнение фенотипов: варианты осуществления процесса Gen 3.0 и Gen 3.1 продемонстрировали сопоставимую экспрессию CD28, CD27 и CD57.

[00249] **Фиг. 37:** Повышенная продукция IFNγ в готовом продукте Gen 3. Анализ на IFNγ (методом ELISA) проводили на замороженном культуральном супернатанте для сравнения обоих процессов. Для каждой опухоли проводили стимуляцию в течение ночи с помощью покрытого анти-CD3 планшета с использованием свежего продукта TIL в каждом из процессов Gen 2 (например, день 22) и Gen 3 (например, день 16). Каждый столбик на графике представляет собой уровни IFNγ стимулированного, нестимулированного и контроля средой.

[00250] **Фиг. 38:** Вверху: анализ уникальных последовательностей CDR3 для готового продукта TIL: столбцы показывают количество уникальных клонотипов TCR B, идентифицированных из 1×10^6 клеток, собранных в процессах 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. Внизу: индекс разнообразия для готового продукта TIL: энтропийный индекс разнообразия Шеннона является более надежным и распространенным показателем для сравнения. Gen 3 продемонстрировал немного большее разнообразие, чем Gen 2.

[00251] **Фиг. 39:** 199 последовательностей являются общими для готового продукта Gen 3 и Gen 2, что соответствует 97,07% из лучших 80% уникальных последовательностей CDR3 из Gen 2, общих с готовым продуктом Gen 3.

[00252] **Фиг. 40:** 1833 последовательностей являются общими для готового продукта Gen 3 и Gen 2, что соответствует 99,45% из лучших 80% уникальных последовательностей CDR3 из Gen 2, общих с готовым продуктом Gen 3.

[00253] **Фиг. 41:** Схема примера осуществления процесса Gen 3 (16-дневный процесс).

[00254] **Фиг. 42:** Блок-схема отбора по PD-1 до экспансии.

[00255] **Фиг. 43:** Структура связывания ниволумаба с PD-1. См. фиг. 5 в Tan, S. et al. (Tan, S. et al., *Nature Communications*, 8:14369 | DOI: 10.1038/ncomms14369 (2017)).

[00256] **Фиг. 44:** Структура связывания пембролизумаба с PD-1. См. фиг. 5 в Tan, S. et al. (Tan, S. et al., *Nature Communications*, 8:14369 | DOI: 10.1038/ncomms14369 (2017)).

[00257] **Фиг. 45:** Был разработан модернизированный протокол для экспансии PD1+ TIL до клинически значимых уровней. Опухоль удаляют у пациента и транспортируют в исследовательские лаборатории. По прибытии опухоль подвергают гидролизу, и суспензию отдельных клеток окрашивают на CD3 и PD1. PD1+ TIL сортируют методом FACS с помощью прибора FX500 (Sony). Фракцию PD1+ клеток помещают в колбу с антителом к CD3 человека (OKT3; 30 нг/мл) и облученными аллогенными МНПК (фидерами) в соотношении 1:100 (TIL:фидеры)) и подвергают быстрой экспансии в течение 22 дней

(REP).

[00258] **Фиг. 46:** Частота PD1+ TIL варьируется в разных образцах опухоли, но процесс экспансии in vitro с высокой степенью надежности дает более 1 миллиарда TIL. Отобранные TIL и основная масса TIL были подвергнуты экспансии из меланомы (n=6), рака легкого (n=7), рака молочной железы (n=6) и саркомы (n=3) (A) Показана частота PD1+ клеток в гидролизатах свежих опухолей для каждого отдельного образца. Горизонтальные и вертикальные линии обозначают соответственно средние значения и стандартные ошибки. (B) Отсортированные PD1+ и PD1- клетки, а также гидролизаты общей массы клеток были подвергнуты экспансии, как описано на фиг. 1. Клетки подсчитывали по завершении REP и вычисляли кратность экспансии (конечное количество клеток/количество высеянных клеток), которые использовали для экстраполяции общего количества клеток. Для общей массы TIL количество высеянных клеток было оценено с использованием процента Т-клеток в гидролизатах опухолей. Средние значения нанесены в виде столбцов, а стандартные ошибки - в виде вертикальных линий.

[00259] **Фиг. 47:** PD1+ TIL демонстрируют отличающийся от PD1- TIL фенотипический профиль. Гидролизаты опухолей из меланомы (n=2), легкого (n=2) и молочной железы (n=2) были оценены фенотипически с помощью проточной цитометрии перед проведением сортировки. (A) Иллюстративные графики экспрессии поверхностных маркеров на TIL из подвергнутой гидролизу меланомы. Образец сначала гейтировали по CD3 и графику с двумя осями, для положительных и отрицательных по PD1 событий. Затем две фракции были подвергнуты неконтролируемой кластеризации viSNE. Верхний ряд содержит положительные по PD1 события, а нижний ряд - отрицательные по PD1 события. (B-C) Живые лимфоциты были гейтированы по CD3+ клеткам и оценены на PD1+ и PD1-. Популяции PD1+ и PD1- оценивали на предмет экспрессии на клеточной поверхности маркеров (B) активации и (C) истощения. Средние значения нанесены в виде столбцов, а стандартные ошибки - в виде вертикальных линий. Статистическую значимость оценивали с помощью парного t-критерия Стьюдента ****P<0,0001, *p<0,05.

[00260] **Фиг. 48:** Экспрессия PD1 снижается при экспансии *in vitro* $PD1^+$ TIL. Предварительно отсортированные PD1+ TIL и подвергнутые экспансии in vitro PD1+ TIL (PD1+-производные TIL) из меланомы (n=1), легкого (n=4) и молочной железы (n=2) оценивали с помощью проточной цитометрии на предмет экспрессии на клеточной поверхности маркеров Т-клеток. Столбцы представляют собой средние проценты каждой субпопуляции в 2 препаратах TIL, а вертикальные линии представляют собой стандартные ошибки. Статистическую значимость оценивали с помощью парного t-критерия Стьюдента ***P<0,001, **p<0,01.

[00261] **Фиг. 49:** Подвергнутые экспансии *in vitro* PD1+ TIL фенотипически схожи с общей массой TIL. PD1+-производные TIL, PD1--производные TIL и общую массу TIL из меланомы (n=5), легкого (n=7), молочной железы (n=6) и саркомы (n=3) оценивали фенотипически с помощью проточной цитометрии на предмет экспрессии на клеточной поверхности маркеров Т-клеток. (A) Были идентифицированы четыре субпопуляции

эффекторов/памяти на основе уровней (CD45RA и CCR7) в CD3+ клетках. TEM=эффекторная память (CD45RA-, CCR7-), TCM=центральная память (CD45RA-, CCR7+), TSCM=память стволовых клеток (CD45RA+, CCR7+), TEMRA=эффекторные Т-клетки (CD45RA+,CCR7-). (B) Также были оценены маркеры дифференцировки, (C) истощения и (D) активации. Столбцы представляют собой средние проценты каждой субпопуляции во всех 3 препаратах TIL, а вертикальные линии представляют собой стандартные ошибки.

[00262] **Фиг. 50:** Подвергнутые экспансии PD1+ TIL являются олигоклональными и содержат часть клонов, присутствующих в общей массе TIL. Отобранные по PD1 TIL и общую массу TIL из меланомы (n=2), молочной железы (n=2) и легкого (n=2) анализировали с помощью РНК-секвенирования. (A) Уникальные пептидные последовательности CDR3 (uCDR3) были пронумерованы и построены коробчатые диаграммы с использованием библиотек pandas и matplotlib Python 3.6.3, Anaconda, Inc. (B) Индексы разнообразия Шеннона были рассчитаны для каждого образца с помощью iRepertoire, а коробчатые диаграммы были построены с использованием библиотек pandas и matplotlib Python 3.6.3, Anaconda, Inc. Столбцы представляют собой средние проценты каждой субпопуляции, а вертикальные линии представляют собой стандартные ошибки. Статистическую значимость оценивали с помощью парного t-критерия Стьюдента ***P<0,001, **p<0,01. (C) Частоты uCDR3 ранжировали в порядке убывания и сообщали или суммировали в указанных интервалах (uCDR3 верхнего ранга, CDR3 ранжировали 2-10, 11-20 и т. д.) для каждого из секвенированных образцов. Затем частоты были усреднены по группам и нанесены на график с помощью Excel v. 1803. (D) Общие клоны uCDR3 были идентифицированы в дополнительных образцах, полученных из общей массы TIL и $PD1^+$. Сумма частот каждого из общих уникальных клонов CDR3 указано в столбцах «% общих».

[00263] **Фиг. 51:** Подвергнутые экспансии PD1+ TIL являются функциональными, как определено по секреции IFNγ и мобилизации CD107a в ответ на неспецифическую стимуляцию. A) PD1+-производные TIL, PD1--производные TIL и общую массу TIL из меланомы (n=5), легкого (n=6) и молочной железы (n=6) стимулировали в течение 18 часов с помощью связанного с планшетом антитела к CD3. Супернатанты оценивали на предмет секреции IFNγ с помощью ELISA. Результаты нанесены на график для отдельных образцов. (B) PD1+-производные TIL, PD1--производные TIL и общую массу TIL из меланомы (n=5), легкого (n=7), молочной железы (n=6) и саркомы (n=1) оценивали на предмет экспрессии CD107a на клеточной поверхности в ответ на стимуляцию PMA в течение 4 часов на клетках CD4+ и CD8+ методом проточной цитометрии. Результаты нанесены на график для отдельных образцов. Горизонтальные линии представляют собой средние проценты каждой субпопуляции, а вертикальные линии представляют собой стандартные ошибки.

[00264] **Фиг. 52:** Подвергнутые экспансии PD1+ TIL демонстрирует усиление уничтожения аутологичных клеток меланомы и противоопухолевой реактивности по сравнению с PD1- TIL. Противоопухолевую реактивность оценивали на отобранном по PD1 продукте TIL из одного образца меланомы. (A) Гидролизат цельной опухоли очищали с

помощью набора для удаления мертвых клеток (Miltenyi). Высевали 1e5 живых клеток на лунку 96-луночного планшета и оставляли для прикрепления на 18 часов при 37°C в приборе xCELLigence (ACEA Biosciences, Inc.). 1e5 PD1+- и PD1--производных аутологичных TIL добавляли в соответствующие лунки, в результате чего получали соотношение клеток 1:1 (TIL:мишень), и инкубировали в течение 48 часов. Уничтожение аутологичных клеток-мишеней регистрировали как увеличение импеданса в результате отделения клеток. Уничтожение клеток (% цитолиза) (самый левый график) рассчитывали по формуле % цитолиза = [1-(NCIst)/(СреднNCIRt)]x100, где NCIst - это нормированный клеточный индекс для образца, а NCIRt - это среднее значение нормированного клеточного индекса для соответствующих референсных лунок (только гидролизат). Правый график демонстрирует нормированные клеточные индексы образцов. (B) 1e5 клеток из гидролизата цельной опухоли культивировали совместно с 1e5 TIL (или гидролизат и TIL по отдельности) в течение 18 часов. Супернатанты оценивали на предмет высвобождения IFNγ с помощью ELISA (R&D systems). Столбцы представляют собой средние значения для параллельных лунок, а вертикальные линии представляют собой стандартные ошибки.

[00265] **Фиг. 53**: Отбор PD1+ клеток из гидролизатов опухолей с использованием сортировки клеток с активированной флуоресценцией.

[00266] **Фиг. 54:** Идентификация метода гидролиза опухолевой ткани.

[00267] **Фиг. 55:** Идентификация метода гидролиза опухолевой ткани с использованием доступных реагентов GMP.

[00268] **Фиг. 56:** Идентификация метода гидролиза опухолевой ткани с использованием доступных реагентов GMP.

[00269] **Фиг. 57:** Идентификация метода гидролиза опухолевой ткани с использованием доступных реагентов GMP.

[00270] **Фиг. 58:** Выход сортировки был выше для свежих гидролизатов опухолей, чем для замороженных.

[00271] **Фиг. 59:** Схожая экспрессия PD1 в свежих и замороженных TIL.

[00272] **Фиг. 60**: Титрование антитела к PD1: переменная экспрессия PD1 с использованием коммерчески доступных клонов.

[00273] **Фиг. 61:** Ниволумаб ингибирует связывание 5 коммерчески доступных окрашивающих антител к PD1.

[00274] **Фиг. 62:** Пембролизумаб избирательно ингибирует связывание 5 коммерчески доступных окрашивающих антител к PD1.

[00275] **Фиг. 63:** MFI PD-1 были значительно снижены, когда клетки были предварительно инкубированы с пембролизумабом.

[00276] **Фиг. 64:** TIL, инкубированные совместно с пембролизумабом и ниволумабом и окрашенные вторичным IgG4, демонстрирует схожую с клоном EH12.2H7 экспрессию PD-1.

[00277] **Фиг. 65:** Инкубация TIL с пембролизумабом и ниволумабом не повлияла на способность обнаруживать поверхностную экспрессию PD1.

[00278] **Фиг. 66:** Результаты сортировки и экспансии для отбора по PD1.

[00279] **Фиг. 67:** Результаты сортировки и экспансии для отбора по PD1.

[00280] **Фиг. 68:** Результаты сортировки и экспансии для отбора по PD1.

[00281] **Фиг. 69.** Оптимальная плотность посева для PD1+-производных TIL составляет более 10000 клеток.

[00282] **Фиг. 70:** PD1+ TIL демонстрируют отличающийся от PD1- TIL фенотипический профиль.

[00283] **Фиг. 71:** PD1+ TIL демонстрируют отличающийся от PD1- TIL фенотипический профиль.

[00284] **Фиг. 72:** Частота PD1+ TIL варьировалась в разных образцах опухоли и требовала 2 циклов REP для преодоления низкой начальной скорости пролиферации.

[00285] **Фиг. 73:** Частота PD1+ TIL варьировалась в разных образцах опухоли и требовала 2 циклов REP для преодоления начальной дефектной пролиферации.

[00286] **Фиг. 74:** Подвергнутые экспансии in vitro PD1+ TIL были фенотипически схожи с общей массой TIL.

[00287] **Фиг. 75:** Экспрессия PD1 снижалась при экспансии in vitro $PD1^+$ TIL.

[00288] **Фиг. 76:** Отобранные по $PD1^+$ TIL являются олигоклональными и содержали часть клонов, присутствующих в общей массе TIL.

[00289] **Фиг. 77:** Отобранные по $PD1^+$ TIL являются олигоклональными и содержали часть клонов, присутствующих в общей массе TIL.

[00290] **Фиг. 78:** Отобранные по $PD1^+$ TIL являются олигоклональными и содержали часть клонов, присутствующих в общей массе TIL.

[00291] **Фиг. 79:** Отобранные по $PD1^+$ TIL являются олигоклональными и содержали часть клонов, присутствующих в общей массе TIL.

[00292] **Фиг. 80:** PD1+-производные TIL являются функциональными, как определено по секреции IFNγ и мобилизации CD107a в ответ на неспецифическую стимуляцию.

[00293] **Фиг. 81:** PD1+-производные TIL демонстрируют усиленное уничтожение по сравнению с $PD1^-$-производными TIL и общей популяцией TIL в меланоме.

[00294] **Фиг. 82:** PD1+-производные TIL демонстрировали усиленное уничтожение опухолевых клеток по сравнению с PD^--производными и производными из общей популяции TIL в меланоме.

[00295] **Фиг. 83:** Иллюстративные варианты осуществления способа экспансии TIL из гемопоэтических злокачественных новообразований с использованием платформы для экспансии Gen 3.

[00296] **Фиг. 84:** Подвергнутые экспансии ex vivo PD1+ TIL демонстрировали эффекторную активность в нескольких анализах in vitro. Данные свидетельствуют о том, что PD1+-отобранные TIL являются антиген-специфичными и обладают более высокой эффекторной функцией.

[00297] **Фиг. 85:** Схематическое изображение иллюстративного варианта

осуществления этапа гидролиза опухоли и отбора по PD-1+, включая отбор PD-1high.

[00298] **Фиг. 86:** Данные и информация по отобранным по PD-1 TIL, включая количества uCDR, а также сведения об экспансии.

[00299] **Фиг. 87:** Стратегия сортировки и данные для PD-1-отобранных TIL с использованием антитела EH12.2H7 к PD-1, а не антитела M1H4 к PD-1.

[00300] **Фиг. 88:** Данные сортировки PD-1-отобранных TIL, показывающие популяции при стратегии гейтирования PD-1high с использованием антитела EH12.2H7 к PD-1.

[00301] **Фиг. 89:** Данные стратегии сортировки PD1+, показывающие оценку антител к PD1 для сортировки: антитела к PD-1 M1H4 и антитела к PD-1 EH12.2H7.

[00302] **Фиг. 90:** Окрашивание на PD-1 для отбора TIL. Данные показывают, что EH12.2H7 и M1H4 демонстрируют разные профили PD1 в МНПК и TIL.

[00303] **Фиг. 91:** Сравнительный анализ TIL, полученных с помощью M1H4, и TIL, полученных с помощью EH12.2H7. Повышенная частота PD1+ в TIL, отсортированных с помощью EH12.2H7.

[00304] **Фиг. 92:** Сниженная кратность экспансии в PD1+-производных TIL, во время REP1 с использованием клона M1H4.

[00305] **Фиг. 93:** Сравнительный анализ TIL, полученных с помощью M1H4, и TIL, полученных с помощью EH12.2H7. В TIL, отсортированных с помощью M1H4, наблюдалась более высокая олигоклональность (снижение разнообразия). (Энтропия Шеннона - это стандартная мера, которая отражает количество различных типов отдельно взятого вида)

[00306] **Фиг. 94:** В PD1+-производных TIL наблюдалась более высокая олигоклональность (снижение разнообразия) по сравнению с общей массой TIL с клоном M1H4, по сравнению с клоном EH12.2H7. (Энтропия Шеннона - это стандартная мера, которая отражает количество различных типов отдельно взятого вида)

[00307] **Фиг. 95:** Иллюстративные данные, демонстрирующие отбор по $PD1^+$: гейтирование по высокому уровню PD1+ (PD-1high).

[00308] **Фиг. 96:** Схема иллюстративного варианта осуществления модифицированного процесса Gen 2, разработанного для TIL, отобранных по PD1.

[00309] **Фиг. 97:** Иллюстративные данные, демонстрирующие отбор по $PD1^+$: гейтирование по высокому уровню PD1+ (PD-1high) для различных образцов опухолей в мелком (вверху) и крупном (внизу) масштабах.

[00310] **Фиг. 98:** Схема иллюстративных вариантов осуществления модифицированных процессов экспансии, разработанных для TIL, отобранных по PD1.

[00311] **Фиг. 99:** Данные, демонстрирующие, что ранний сбор в REP на день 17 для условия PD1+ дал 55e9 и 37e9 TIL.

[00312] **Фиг. 100:** Демонстрирует секрецию IFNγ в двух образцах опухолей для нескольких условий процесса экспансии, как описано на фиг. 96 и 98.

[00313] **Фиг. 101:** Демонстрирует секрецию гранзима B в двух образцах опухолей

для нескольких условий процесса экспансии, как описано на фиг. 96 и 98.

[00314] **Фиг. 102:** Демонстрирует CD3+CD45+ популяции в одном образце опухоли для нескольких условий процесса экспансии, как описано на фиг. 96 и 98. Условия PD1+ Gen 2 представляли собой > 90% CD3+CD45+.

[00315] **Фиг. 103:** Демонстрирует CD3+CD45+ популяции в одном образце опухоли для нескольких условий процесса экспансии, как описано на фиг. 96 и 98. Условия PD1+ Gen 2 представляли собой > 90% CD3+CD45+.

[00316] **Фиг. 104:** Демонстрирует характеристики профиля TIL для одного образца опухоли для нескольких условий процесса экспансии, как описано на фиг. 96 и 98. Чистота: > 90% TCR a/b+отсутствие обнаружимых NK, моноцитов или B-клеток.

[00317] **Фиг. 105:** Демонстрирует характеристики профиля TIL для одного образца опухоли для нескольких условий процесса экспансии, как описано на фиг. 96 и 98. Чистота: > 90% TCR a/b+отсутствие обнаружимых NK, моноцитов или B-клеток.

[00318] **Фиг. 106A-B:** Демонстрирует характеристики профиля TIL для двух образцов опухолей для нескольких условий процесса экспансии, как описано на фиг. 96 и 98. Дифференцировка: Статус дифференцировки PD1+ Gen 2 был сопоставимым

[00319] **Фиг. 107A-B:** Демонстрирует характеристики профиля TIL для двух образцов опухолей для нескольких условий процесса экспансии, как описано на фиг. 96 и 98. Память: PD1+ Gen 2 в основном представляли собой TIL эффекторной памяти

[00320] **Фиг. 108A-B:** Демонстрирует характеристики профиля TIL для двух образцов опухолей для нескольких условий процесса экспансии, как описано на фиг. 96 и 98. Статусы активации и истощения по CD4+ были схожими.

[00321] **Фиг. 109:** Демонстрирует характеристики профиля TIL для двух образцов опухолей для нескольких условий процесса экспансии, как описано на фиг. 96 и 98. Статусы активации и истощения по CD8+ были схожими.

[00322] **Фиг. 110:** Иллюстративные данные, демонстрирующие отбор по $PD1^+$: гейтирование по высокому уровню PD1+ (PD-1high) для различных образцов опухолей, сравнение результатов до и после сортировки.

[00323] **Фиг. 111:** Иллюстративные данные, демонстрирующие отбор по $PD1^+$: гейтирование по высокому уровню PD1+ (PD-1high) для образца опухоли L4097.

[00324] **Фиг. 112:** Иллюстративные данные, демонстрирующие отбор по $PD1^+$: гейтирование по высокому уровню PD1+ (PD-1high) для образца опухоли L4089.

[00325] **Фиг. 113:** Иллюстративные данные, демонстрирующие отбор по $PD1^+$: гейтирование по высокому уровню PD1+ (PD-1high) для образца опухоли H3035.

[00326] **Фиг. 114:** Иллюстративные данные, демонстрирующие отбор по $PD1^+$: гейтирование по высокому уровню PD1+ (PD-1high) для образца опухоли M1139.

[00327] **Фиг. 115:** Иллюстративные данные, демонстрирующие отбор по $PD1^+$: гейтирование по высокому уровню PD1+ (PD-1high) для образца опухоли L4100.

[00328] **Фиг. 116:** Иллюстративные данные, демонстрирующие отбор по $PD1^+$: гейтирование по высокому уровню PD1+ (PD-1high) для образца опухоли OV8030.

[00329] **Фиг. 117:** Иллюстративные данные, демонстрирующие отбор по $PD1^+$: гейтирование по высокому уровню PD1+ (PD-1high) для образца опухоли L4104.

[00330] **Фиг. 118:** Иллюстративные данные, демонстрирующие отбор по $PD1^+$: гейтирование по высокому уровню PD1+ (PD-1high) для образца опухоли M1132.

[00331] **Фиг. 119:** Иллюстративные данные, демонстрирующие отбор по $PD1^+$: гейтирование по высокому уровню PD1+ (PD-1high) для образца опухоли M1136.

[00332] **Фиг. 120:** Иллюстративные данные, демонстрирующие отбор по $PD1^+$: гейтирование по высокому уровню PD1+ (PD-1high) для образца опухоли H3037.

[00333] **Фиг. 121:** Иллюстративные данные, демонстрирующие отбор по $PD1^+$: гейтирование по высокому уровню PD1+ (PD-1high) для образца опухоли L4106.

[00334] **Фиг. 122:** Иллюстративные данные, демонстрирующие отбор по $PD1^+$: гейтирование по высокому уровню PD1+ (PD-1high) для образца опухоли L1141.

[00335] **Фиг. 123:** Иллюстративные данные, демонстрирующие отбор по $PD1^+$: гейтирование по высокому уровню PD1+ (PD-1high) для образца опухоли L4096.

[00336] **Фиг. 124:** Иллюстративные данные, демонстрирующие отбор по $PD1^+$: гейтирование по высокому уровню PD1+ (PD-1high) для образца опухоли H3038.

[00337] **Фиг. 125:** Иллюстративные данные, демонстрирующие отбор по $PD1^+$: гейтирование по высокому уровню PD1+ (PD-1high) для образца опухоли L4101. (Примечание: потенциальная проблема гейтирования с CD8 на третьей панели.)

[00338] **Фиг. 126:** Иллюстративные данные, демонстрирующие отбор по $PD1^+$: гейтирование по высокому уровню PD1+ (PD-1high) для образца опухоли L4097.

[00339] **Фиг. 127:** Данные, демонстрирующие экспансию в различных отобранных по PD-1 популяциях. Подвергнутые экспансии клетки PD-1high могут иметь сниженную экспансию в REP1.

[00340] **Фиг. 128:** Сводные результаты сортировки и экспансии для отбора по PD-1. Сортировка $PD1^{high}$ клеток с использованием антитела EH12.2H7 к PD-1.

[00341] **Фиг. 129:** Сводные результаты сортировки и экспансии для отбора по PD-1. Сортировка $PD1^{high}$ клеток с использованием антитела EH12.2H7 к PD-1.

[00342] **Фиг. 130:** Графическое представление сводных данных для результатов сортировки и экспансии для отбора по PD-1 с фиг. 128 и 129. Сортировка $PD1^{high}$ клеток с использованием антитела EH12.2H7 к PD-1.

[00343] **Фиг. 131:** демонстрирует структуры I-A и I-B, цилиндры относятся к отдельным связывающим доменам полипептидов. Структуры I-A и I-B содержат три линейно связанных связывающих TNFRSF домена, полученных, например, из 4-1BBL или антитела, связывающего 4-1BB, которые сворачиваются с образованием трехвалентного белка, который затем связывается со вторым трехвалентным белком через IgG1-Fc (включая домены CH3 и CH2), который используется для связывания вместе двух трехвалентных белков посредством дисульфидных связей (небольшие удлиненные овалы), что стабилизирует структуру и обеспечивает агонисты, способные объединять внутриклеточные сигнальные домены шести рецепторов и сигнальных белков с

образованием сигнального комплекса. Связывающие TNFRSF домены, обозначенные цилиндрами, могут представлять собой домены scFv, содержащие, например, цепь VH и VL, соединенные линкером, который может содержать гидрофильные остатки и последовательности Gly и Ser для гибкости, а также Glu и Lys для растворимости.

[00344] **Фиг. 132:** Данные, демонстрирующие выбранный сбор 100000 клеток для обоих выпадающих меню, показанных выше. Убедились, что клеточные популяции были гейтированы правильно. Гейты были установлены на высокий, средний и низкий уровень с использованием МНПК, контроля FMO и самого образца, чтобы различить эти три популяции.

[00345] **Фиг. 133:** Вверху слева: это контроль FMO. Необходимо убедиться, что гейты int и high меньше 0,5%. Вверху справа: иллюстративный график с нечетким разделением high и mid. Фон в этот день был выше, поэтому отрицательный гейт оказался выше. Внизу: четкое представление high и mid. В зависимости от имеющихся данных может потребоваться отрегулировать настройки BSC или FSC. Напряжения для других каналов не регулировали. При необходимости регулировали гейт PD1.

[00346] **Фиг. 134:** Уникальный состав CDR3vβ в PD1-отобранных и неотобранных TIL. Подвергнутые экспансии неотобранные и PD1-отобранные TIL из 2 ПКГШ и 5 НМРЛ анализировали на предмет их репертуара CDR3vβ. Количество уникальных CDR3β, отмеченное количество uCDR3, (A.) и индекс разнообразия, выраженный как энтропия Шеннона (B.), нанесены на график для каждого отдельного образца. Парные образцы соединены цветными линиями. P-значения, рассчитанные с помощью парного t-критерия, отмечены на соответствующих графиках.

[00347] **Фиг. 135:** Графики, демонстрирующие клональное перекрытие между PD1-отобранными и неотобранными TIL. Подвергнутые экспансии TIL из 2 ПКГШ и 5 НМРЛ анализировали на предмет их репертуара CDR3vβ. A. Количество уникальных CDR3vβ, общих для PD1-отобранных (синий) и неотобранных (красный) образцов TIL, показано на пересечении диаграммы Венна для каждого отдельного образца опухоли (B. - C). Процент и доля, общие для TIL в неотобранных и PD1-отобранных TIL, нанесены на график для каждого отдельного образца. Парные образцы соединены цветными линиями. P-значения, рассчитанные с помощью парного t-критерия, отмечены на соответствующих графиках.

[00348] **Фиг. 136:** Частота 10 лучших клонов PD1-отобранных TIL в неотобранном продукте TIL. (A. - C.) Подвергнутые экспансии PD1-отобранные и неотобранные TIL из 2 ПКГШ и 5 НМРЛ анализировали на предмет их репертуара CDR3vβ. Уникальные последовательности CDR3vβ, идентифицированные в PD1-отобранном продукте TIL, ранжировали от наиболее до наименее частых. На графике нанесены частоты каждого из 10 лучших клонов PD1-отобранных TIL в каждом из парных продуктов. Парные образцы соединены простыми линиями. P-значения, рассчитанные с помощью парного t-критерия, отмечены на соответствующих графиках.

[00349] **Фиг. 137:** Описание гидролизатов опухолей, использованных для этих исследований.

[00350] **Фиг. 138**: Обнаружение $PD1^+$ клеток в гидролизатах опухолей из различных гистологий. Легенда: экспрессия PD1 в нескольких гистологиях. Процент $PD1^+$ TIL в популяции $CD3^+$ TIL нанесен на график для отдельных образцов в каждой гистологии. Горизонтальные линии представляют собой средние проценты каждой субпопуляции, а вертикальные линии представляют собой стандартные ошибки.

[00351] **Фиг. 139:** Описание PD1-отобранных и неотобранных TIL, использованных для этого исследования.

[00352] **Фиг. 140:** Сниженная кратность экспансии в PD1-отобранных TIL во время REP1, но не REP2. Легенда: PD1-отсортированные и неотобранные с меланомы, (B) НМРЛ и (C) ПКГШ были подвергнуты экспансии с помощью двух 11-дневных REP. Кратность экспансии для всех исследованных опухолей показана на (D). Общие количества клеток по завершении REP1 и REP2 использовали для расчета кратностей экспансии в популяциях TIL. Результаты нанесены на график для отдельных образцов, где черные точки обозначают PD1-отобранные TIL, а серые треугольники - неотобранные TIL. Горизонтальные линии представляют собой средние проценты каждой субпопуляции, а вертикальные линии представляют собой стандартные ошибки. Статистическую значимость оценивали с помощью парного t-критерия Стьюдента; * обозначает p-значение <0,05.

[00353] **Фиг. 141:** Результаты экспансии из различных образцов опухолей.

[00354] **Фиг. 142:** Описание PD1-отобранных и неотобранных TIL, использованных для этого исследования. Продукты PD1-отобранных и неотобранных TIL были получены из 4 образцов меланомы, 7 ПКГШ и 2 НМРЛ в соответствии с процедурой TMP-18-015. Вкратце, цельные биоптаты опухолей подвергали гидролизу с использованием смеси ДНКазы, гиалуронидазы и коллагеназы IV. Часть полученной суспензии отдельных клеток окрашивали на PD1 и сортировали на приборе FX500 (Sony, HQ, New York). Клетки, отсортированные по PD1, и неотобранный гидролизат цельной опухоли подвергали двум 11-дневным фазам быстрой экспансии (REP) для получения PD1-отобранных TIL и неотобранных TIL, соответственно.

[00355] **Фиг. 143:** PD1-отобранные TIL и неотобранные TIL продуцируют IFNγ и гранзим B в ответ на стимуляцию активационными гранулами. Легенда: PD1-отобранные TIL и неотобранные TIL из 4 образцов меланомы, 7 НМРЛ и 2 ПКГШ оценивали на предмет секреции (A) IFNγ и (B) гранзима. Результаты нанесены на график для отдельных образцов, где черные точки обозначают условие отсутствия стимуляции, а серые треугольники - условие стимуляции αCD3/αCD28/α41BB. Горизонтальные линии представляют собой средние проценты каждой субпопуляции, а вертикальные линии представляют собой стандартные ошибки. Статистическую значимость оценивали с помощью парного t-критерия Стьюдента; ** обозначает p-значение <0,01.

[00356] **Фиг. 144:** PD1-отобранные и неотобранные TIL мобилизуют CD107a в ответ на стимуляцию PMA/иономицином. Легенда: PD1-отобранные и неотобранные TIL из 4 образцов меланомы, 5 НМРЛ и 1 ПКГШ оценивали с помощью проточной цитометрии на предмет экспрессии CD107a на клеточной поверхности в ответ на стимуляцию PMA и

иономицином (BioLegend, Калифорния). Результаты нанесены на график для отдельных образцов, где черные точки обозначают условие отсутствия стимуляции, а серые треугольники - условие стимуляции PMA/иономицином. Горизонтальные линии представляют собой средние проценты каждой субпопуляции, а вертикальные линии представляют собой стандартные ошибки.

[00357] **Фиг. 145:** Описание PD1-отобранных и неотобранных TIL, использованных для этого исследования.

[00358] **Фиг. 146:** PD1-отобранные и неотобранные TIL демонстрируют реактивность в отношении аутологичной опухоли *in vitro*. Уничтожение опухоли и реактивность оценивали в PD1-отобранных TIL и неотобранных TIL. (A) Клеточные индексы и (B) уничтожение опухолевых клеток (% цитолиза) показаны для образца меланомы. Супернатанты из 2 НМРЛ и 3 меланом оценивали на предмет (C) высвобождения IFNγ с помощью ELISA. Средние значения нанесены в виде столбцов, а стандартные ошибки - в виде вертикальных линий. Статистическую значимость оценивали с помощью парного t-критерия Стьюдента; ** обозначает p-значение <0,01.

[00359] **Фиг. 147:** Описание PD1-отобранных и неотобранных TIL, использованных для примера 16. Продукты PD1-отобранных и неотобранных TIL были получены из 4 образцов меланомы, 7 ПКГШ и 2 НМРЛ в соответствии с процедурой TMP-18-015. Вкратце, цельные биоптаты опухолей подвергали гидролизу с использованием смеси ДНКазы, гиалуронидазы и коллагеназы IV. Часть полученной суспензии отдельных клеток окрашивали на PD1 и сортировали на приборе FX500 (Sony, HQ, New York). PD1-отобранные и неотобранные TIL были подвергнуты двум 11-дневным REP.

[00360] **Фиг. 148**: Фиг. 1: Сравнение уровней $CD4^+$ и $CD8^+$ Т-клеток в PD1-отобранных и неотобранных TIL. Легенда: PD1-отобранные и неотобранные TIL из 4 образцов меланом, 7 НМРЛ и 2 ПКГШ оценивали на линии Т-клеток (CD4 и CD8) с помощью проточной цитометрии. Результаты выражены в процентах $CD3^+$ клеток. Средние значения нанесены в виде столбцов, а стандартные ошибки - в виде вертикальных линий.

[00361] **Фиг. 149:** Сравнение статуса дифференциации $PD1^-$отобранных TIL с неотобранными TIL. Легенда: PD1-отобранные TIL и неотобранные TIL из 4 образцов меланом, 7 НМРЛ и 2 ПКГШ оценивали на предмет экспрессии CD27, CD28, CD56, CD57 и KLRG1 с использованием проточной цитометрии. Результаты выражены в процентах $CD3^+$ клеток. Средние значения нанесены в виде столбцов, а стандартные ошибки - в виде вертикальных линий. Статистическую значимость оценивали с помощью парного t-критерия Стьюдента; * обозначает p-значение <0,05.

[00362] **Фиг. 150**: Сравнение распределения субпопуляций Т-клеток памяти в PD1-отобранных TIL и неотобранных TIL. Легенда: PD1-отобранные TIL и неотобранные TIL из 4 образцов меланом, 7 НМРЛ и 2 ПКГШ оценивали на предмет экспрессии маркеров памяти CD45RA и CCR7 с помощью проточной цитометрии. Субпопуляции Т-клеток памяти были определены, как указано, и средние процентные содержания каждой субпопуляции были нанесены на график в виде черных столбцов для PD1-отобранных TIL

и серых столбцов для неотобранных TIL. Стандартные ошибки показаны вертикальными линиями.

[00363] **Фиг. 151:** Сравнение статуса активации PD1-отобранных TIL и неотобранных TIL. Легенда: PD1-отобранные TIL и неотобранные TIL из 4 образцов меланом, 7 НМРЛ и 2 ПКГШ оценивали на предмет экспрессии CD25, CD69, CD134 и CD137. Средние проценты $CD3^+$ Т-клеток были нанесены на график в виде черных столбцов для PD1-отобранных TIL и серых столбцов для неотобранных TIL. Стандартные ошибки показаны вертикальными линиями. Статистическую значимость оценивали с помощью парного t-критерия Стьюдента; * обозначает p-значение <0,05.

[00364] **Фиг. 152:** Сравнение экспрессии маркеров истощения/ингибирования в PD1-отобранных TIL и неотобранных TIL. Легенда: PD1-отобранные TIL и неотобранные TIL из 4 образцов меланом, 7 НМРЛ и 2 ПКГШ оценивали на предмет экспрессии LAG3, PD1, TIM3 и CD101 с помощью проточной цитометрии. Средние значения нанесены в виде столбцов, а стандартные ошибки - в виде вертикальных линий. Статистическую значимость оценивали с помощью парного t-критерия Стьюдента; *** обозначает p-значение <0,001.

[00365] **Фиг. 153:** Сравнение экспрессии маркеров резидентных Т-клеток памяти в PD1-отобранных и неотобранных TIL. PD1-отобранные TIL и неотобранные TIL из 4 образцов меланом, 7 НМРЛ и 2 ПКГШ оценивали на предмет экспрессии CD39, CD49a и CD103 с помощью проточной цитометрии. Средние значения нанесены в виде столбцов, а стандартные ошибки - в виде вертикальных линий. Статистическую значимость оценивали с помощью парного t-критерия Стьюдента; ** обозначает p-значение <0,01.

[00366] **Фиг. 154:** Варианты осуществления полномасштабных процессов для культуры PD1 TIL.

[00367] **Фиг. 155:** Обзор мелкомасштабного процесса: PD1-A - это условие, при котором используется процедура окрашивания ниволумабом, описанная в этом протоколе. PD1 -B - это условие, при котором используется метод окрашивания анти-PD1-PE (клон № EH12.2H7). Условие общей популяции служит контролем.

[00368] **Фиг. 156:** Чистота после сортировки (%PD-1+) для всех трех опухолей удовлетворяла критерию $\geq$ 80% (A. и B.). Несколько более низкая чистота, наблюдаемая для меланомы по сравнению с опухолями головы и шеи, скорее всего, связана с более низкой экспрессией PD-1+ клеток при сортировке.

[00369] **Фиг. 157:** Обнаружение $PD\text{-}1^+$ клеток в гидролизатах опухолей из различных гистологий. Экспрессия PD-1 в нескольких гистологиях. Процент $PD\text{-}1^+$ TIL в популяции $CD3^+$ TIL нанесен на график для отдельных образцов в каждой гистологии. Горизонтальные линии представляют собой средние проценты каждой субпопуляции, а вертикальные линии представляют собой стандартные ошибки.

[00370] **Фиг. 158A-158P:** графики данных FACS.

[00371] **Фиг. 159:** PD-1-отобранные TIL, отсортированные с использованием либо ниволумаба, либо EH12.2H7 для идентификации PD-1+ TIL, из 1 образца опухоли яичника, 1 образца меланомы и 1 ПКГШ, оценивали на линию Т-клеток (CD4 и CD8) с помощью

проточной цитометрии. Результаты выражены в процентах $CD3^+$ клеток. Средние значения нанесены в виде столбцов, а стандартные ошибки - в виде вертикальных линий.

[00372] **Фиг. 160:** PD-1-отобранные TIL из 1 образца опухоли яичника, 1 меланомы и 1 опухоли ПКГШ, отсортированные с использованием либо ниволумаба, либо EH12.2H7 для идентификации PD-1+ TIL, оценивали на предмет экспрессии маркеров памяти CD45RA и CCR7 с помощью проточной цитометрии. Субпопуляции Т-клеток памяти (TN/TSCM) были определены, как указано, и средние процентные содержания каждой субпопуляции были нанесены на график в виде черных столбцов для PD1-отобранных TIL, полученных с помощью ниволумаба, и серых столбцов для PD1-отобранных TIL, полученных с помощью EH12.2H7. Стандартные ошибки показаны вертикальными линиями.

[00373] **Фиг. 161A:** PD-1-отсортированные TIL из 1 образца опухоли яичника, 1 меланомы и 1 опухоли ПКГШ, отсортированные с использованием либо ниволумаба, либо EH12.2H7 для идентификации PD-1+ TIL, оценивали на предмет экспрессии PD-1 до и после экспансии. Чистоту после сортировки отсортированного по PD-1 продукта использовали для определения процентного содержания $PD\text{-}1^+$ перед экспансией. Средние значения нанесены в виде столбцов, а стандартные ошибки - в виде вертикальных линий. Статистическую значимость оценивали с помощью парного t-критерия Стьюдента; ** обозначает p-значение $<0,01$.

[00374] Фиг. 161B: PD-1-отобранные TIL из 1 образца опухоли яичника, 1 меланомы и 1 опухоли ПКГШ, отсортированные с использованием либо ниволумаба, либо EH12.2H7 для идентификации PD-1+ TIL, оценивали на предмет секреции (A) IFNγ и (B) гранзима B. Результаты нанесены на график для отдельных образцов, где черные точки обозначают условие отсутствия стимуляции, а серые треугольники - условие стимуляции αCD3/αCD28/α41BB. Горизонтальные линии представляют собой средние проценты каждой субпопуляции, а вертикальные линии представляют собой стандартную ошибку.

[00375] **Фиг. 162:** Уровни PD-1 в TIL, окрашенных ниволумабом и EH12.2H7, до сортировки. Гидролизаты цельных опухолей разделяли и окрашивали либо ниволумабом, либо EH12.2H7, и оценивали с помощью проточной цитометрии. Затем $PD\text{-}1^+$ клетки, идентифицированные с использованием каждого из антител, из 1 образца опухоли яичника, 1 меланомы и 1 ПКГШ, были отсортированы с использованием сортировщика клеток FX500 (SONY, NY).

[00376] **Фиг. 163:** Уровни PD-1 в TIL, окрашенных ниволумабом и EH12.2H7, после сортировки.

[00377] **Фиг. 164:** Гидролизаты цельных опухолей разделяли и окрашивали либо ниволумабом, либо EH12.2H7, и оценивали с помощью проточной цитометрии. Затем $PD\text{-}1^+$ клетки, идентифицированные с использованием каждого из антител, из 1 образца опухоли яичника, 1 меланомы и 1 ПКГШ, были отсортированы с использованием сортировщика клеток FX500 (SONY, NY).

[00378] **Фиг. 165:** Обнаружение $PD\text{-}1^+$ клеток в гидролизатах опухолей из различных

гистологий. Экспрессия PD-1 в нескольких гистологиях. Процент PD-1$^+$ TIL в популяции CD3$^+$ TIL нанесен на график для отдельных образцов в каждой гистологии. Горизонтальные линии представляют собой средние проценты каждой субпопуляции, а вертикальные линии представляют собой стандартные ошибки.

[00379] **Фиг. 166.** Сниженная кратность экспансии в PD-1-отобранных TIL во время фазы активации, но не REP. PD-1-отсортированные TIL и гидролизаты цельных опухолей из 4 образцов меланомы, 7 образцов опухоли НМРЛ и 2 образцов опухоли HNSCC были подвергнуты экспансии с использованием двухэтапного процесса, состоящего из 11-дневного этапа активации с последующим 11-дневным REP. Показана кратность экспансии для всех исследованных опухолей. Общие количества клеток по завершении этапов активации и REP использовали для расчета кратностей экспансии в популяциях TIL. Результаты нанесены на график для отдельных образцов, где черные точки обозначают PD-1-отобранные TIL, а серые треугольники - неотобранные TIL. Горизонтальные линии представляют собой средние проценты каждой субпопуляции, а вертикальные линии представляют собой стандартные ошибки.

[00380] **Фиг. 167:** Уровни CD4$^+$ и CD8$^+$ Т-клеток в PD-1-отобранных и неотобранных TIL. PD-1-отобранные и неотобранные TIL из 4 образцов меланомы, 7 образцов опухоли НМРЛ и 2 образцов опухоли ПКГШ оценивали на линии Т-клеток (CD4 и CD8) с помощью проточной цитометрии. Результаты выражены в процентах CD3$^+$ клеток. Средние значения нанесены в виде столбцов, а стандартные ошибки - в виде вертикальных линий.

[00381] **Фиг. 168**: Сравнение распределения субпопуляций Т-клеток памяти в PD1-отобранных TIL и неотобранных TIL. PD-1-отобранные TIL и неотобранные TIL из 4 образцов меланомы, 6 образцов опухоли НМРЛ и 2 образцов опухоли ПКГШ оценивали на предмет экспрессии маркеров памяти CD45RA и CCR7 с помощью проточной цитометрии. Субпопуляции Т-клеток памяти были определены, как указано, и средние процентные содержания каждой субпопуляции были нанесены на график в виде черных столбцов для PD-1-отобранных TIL и серых столбцов для неотобранных TIL. Стандартные ошибки показаны вертикальными линиями.

[00382] **Фиг. 169:** Экспрессия PD-1 в PD-1$^+$ отсортированных TIL и неотсортированных TIL до и после экспансии. PD-1-отсортированные TIL и гидролизаты цельных опухолей из 3 образцов меланомы, 7 образцов опухоли НМРЛ и 2 образцов опухоли ПКГШ оценивали на предмет экспрессии PD-1 до и после экспансии. Чистоту после сортировки отсортированного по PD1$^+$ продукта использовали для определения процентного содержания PD-1$^+$ TIL перед экспансией. Средние значения нанесены в виде столбцов, а стандартные ошибки - в виде вертикальных линий. Статистическую значимость оценивали с помощью парного t-критерия Стьюдента; *** и **** обозначает p-значение <0,001 и <0,0001, соответственно.

[00383] **Фиг. 170:** Частота 10 лучших PD-1-отобранных клонов TCRvβ в неотобранных TIL. Легенда: Подвергнутые экспансии PD-1-отобранные и неотобранные

TIL из 2 образцов опухоли ПКГШ и 5 образцов опухоли НМРЛ анализировали на предмет их репертуара CDR3vβ. Уникальные последовательности CDR3vβ, идентифицированные в PD-1-отобранном продукте TIL, ранжировали от наиболее до наименее частых. На графике нанесены частоты «10 лучших» (т. е. 10 наиболее часто встречающихся клонов) клонов PD-1-отобранных TIL в каждом из парных продуктов. Парные образцы соединены простыми линиями. P-значения, рассчитанные с помощью парного t-критерия, отмечены на соответствующих графиках.

[00384] **Фиг. 171:** PD-1-отобранные TIL демонстрирует превосходную реактивность в отношении аутологичной опухоли по сравнению с аналогичными неотобранными TIL. PD-1-отобранные и соответствующие неотобранные TIL, полученные из 3 образцов меланомы, 2 образцов НМРЛ, 1 образца РС и 1 образца TNBC, были протестированы на предмет секреции IFNγ с помощью ELISA в ответ на 18-24-часовую инкубацию с гидролизатами аутологичных опухолей. Разница в концентрации IFNγ, измеренная с блокирующим HLA антителом класса I и без него, показана для каждого отдельного образца. Положительные значения отражают HLA-специфические противоопухолевые ответы, а нулевые или отрицательные значения отражают неспецифические ответы.

[00385] **Фиг. 172:**PD-1-отобранные и неотобранные TIL демонстрируют уничтожение аутологичных опухолей. Уничтожение опухоли и реактивность оценивали в PD-1-отобранных TIL и неотобранных TIL с использованием системы анализа клеток в реальном времени xCELLigence. (A) Клеточные индексы и (B) уничтожение опухолевых клеток (% цитолиза) показаны для образца меланомы.

[00386] **Фиг. 172:** Уровни PD-1 в TIL, окрашенных ниволумабом и EH12.2H7. Гидролизаты цельных опухолей разделяли и окрашивали либо ниволумабом, либо EH12.2H7, и оценивали с помощью проточной цитометрии. Затем PD-1$^+$ клетки, идентифицированные с использованием каждого из антител, из 1 образца опухоли яичника, 1 меланомы и 1 ПКГШ, были отсортированы с использованием сортировщика клеток FX500 (SONY, NY).

[00387] **Фиг. 173:** Выход готового продукта PD-1-отсортированных TIL, окрашенных ниволумабом и EH12.2H7. PD-1-отсортированные TIL, полученные в результате окрашивания TIL ниволумабом и EH12.2H7, из 1 образца яичника, 1 меланомы и 1 ПКГШ, были подвергнуты экспансии с использованием 11-дневного этапа активации с последующим 11-дневным REP. Показано количество высеянных CD3$^+$ клеток, кратность экспансии и экстраполированные/фактические количества клеток. Опухоли яичника и меланома, обозначенные *, были мелкомасштабными экспериментами, а ПКГШ, обозначенные **, проводились в полном масштабе.

[00388] **Фиг. 174:** Экспрессия CD4+ и CD8+ TIL в PD-1-отобранных TIL с использованием EH12.2H7 и ниволумаба. PD-1-отобранные TIL, отсортированные с использованием либо ниволумаба, либо EH12.2H7 для идентификации PD-1+ TIL, из 1 образца опухоли яичника, 1 образца меланомы и 1 ПКГШ, оценивали на линию Т-клеток (CD4 и CD8) с помощью проточной цитометрии. Результаты выражены в процентах CD3$^+$

клеток. Средние значения нанесены в виде столбцов, а стандартные ошибки - в виде вертикальных линий.

[00389] **Фиг. 175:** Популяции памяти в отсортированных с помощью EH12.2H7 и ниволумаба PD-1+ TIL. PD-1-отобранные TIL из 1 образца опухоли яичника, 1 меланомы и 1 опухоли ПКГШ, отсортированные с использованием либо ниволумаба, либо EH12.2H7 для идентификации PD-1+ TIL, оценивали на предмет экспрессии маркеров памяти CD45RA и CCR7 с помощью проточной цитометрии. Субпопуляции Т-клеток памяти были определены, как указано, и средние процентные содержания каждой субпопуляции были нанесены на график в виде черных столбцов для PD1-отобранных TIL, полученных с помощью ниволумаба, и серых столбцов для PD1-отобранных TIL, полученных с помощью EH12.2H7. Стандартные ошибки показаны вертикальными линиями.

[00390] **Фиг. 176:** Экспрессия PD-1 в PD-1-отсортированных TIL, созданных с использованием EH12.2H7 и ниволумаба, до и после экспансии. PD-1-отсортированные TIL из 1 образца опухоли яичника, 1 меланомы и 1 ПКГШ, отсортированные с использованием либо ниволумаба, либо EH12.2H7 для идентификации PD-1+ TIL, оценивали на предмет экспрессии PD-1 до и после экспансии. Чистоту после сортировки отсортированного по PD-1 продукта использовали для определения процентного содержания PD-1^+ перед экспансией. Средние значения нанесены в виде столбцов, а стандартные ошибки - в виде вертикальных линий. Статистическую значимость оценивали с помощью парного t-критерия Стьюдента; ** обозначает p-значение <0,01.

[00391] **Фиг. 177:** PD-1-отобранные TIL, созданные с использованием отсортированных с помощью EH12.2H7 и ниволумаба PD-1^+ TIL, продуцировали IFNγ и гранзим B в ответ на неспецифическую стимуляцию. PD-1-отобранные TIL из 1 образца опухоли яичника, 1 меланомы и 1 ПКГШ, отсортированные с использованием либо ниволумаба, либо EH12.2H7 для идентификации PD-1^+ TIL, оценивали на предмет секреции (A) IFNγ и (B) гранзима B. Результаты нанесены на график для отдельных образцов, где черные точки обозначают условие отсутствия стимуляции, а серые треугольники - условие стимуляции αCD3/αCD28/α41BB. Горизонтальные линии представляют собой средние проценты каждой субпопуляции, а вертикальные линии представляют собой стандартную ошибку.

[00392] **Фиг. 178:** Обзор варианта осуществления процесса PD-1+High Gen-2.

[00393] **Фиг. 179:** Данные графика FACS.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ПЕРЕЧНЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

[00394] SEQ ID NO:1 представляет собой аминокислотную последовательность тяжелой цепи муромонаба.

[00395] SEQ ID NO:2 представляет собой аминокислотную последовательность легкой цепи муромонаба.

[00396] SEQ ID NO:3 представляет собой аминокислотную последовательность рекомбинантного белка IL-2 человека.

[00397] SEQ ID NO:4 представляет собой аминокислотную последовательность

альдеслейкина.

[00398] SEQ ID NO:5 представляет собой аминокислотную последовательность рекомбинантного белка IL-4 человека.

[00399] SEQ ID NO:6 представляет собой аминокислотную последовательность рекомбинантного белка IL-7 человека.

[00400] SEQ ID NO:7 представляет собой аминокислотную последовательность рекомбинантного белка IL-15 человека.

[00401] SEQ ID NO:8 представляет собой аминокислотную последовательность рекомбинантного белка IL-21 человека.

[00402] SEQ ID NO:9 представляет собой аминокислотную последовательность 4-1BB человека.

[00403] SEQ ID NO:10 представляет собой аминокислотную последовательность мышиного 4-1BB.

[00404] SEQ ID NO:11 представляет собой тяжелую цепь моноклонального антитела-агониста 4-1BB утомилумаба (PF-05082566).

[00405] SEQ ID NO:12 представляет собой легкую цепь моноклонального антитела-агониста 4-1BB утомилумаба (PF-05082566).

[00406] SEQ ID NO:13 представляет собой вариабельную область тяжелой цепи (VH) для моноклонального антитела-агониста 4-1BB утомилумаба (PF-05082566).

[00407] SEQ ID NO:14 представляет собой вариабельную область легкой цепи (VL) для моноклонального антитела-агониста 4-1BB утомилумаба (PF-05082566).

[00408] SEQ ID NO:15 представляет собой CDR1 тяжелой цепи для моноклонального антитела-агониста 4-1BB утомилумаба (PF-05082566).

[00409] SEQ ID NO:16 представляет собой CDR2 тяжелой цепи для моноклонального антитела-агониста 4-1BB утомилумаба (PF-05082566).

[00410] SEQ ID NO:17 представляет собой CDR3 тяжелой цепи для моноклонального антитела-агониста 4-1BB утомилумаба (PF-05082566).

[00411] SEQ ID NO:18 представляет собой CDR1 легкой цепи для моноклонального антитела-агониста 4-1BB утомилумаба (PF-05082566).

[00412] SEQ ID NO:19 представляет собой CDR2 легкой цепи для моноклонального антитела-агониста 4-1BB утомилумаба (PF-05082566).

[00413] SEQ ID NO:20 представляет собой CDR3 легкой цепи для моноклонального антитела-агониста 4-1BB утомилумаба (PF-05082566).

[00414] SEQ ID NO:21 представляет собой тяжелую цепь моноклонального антитела-агониста 4-1BB урелумаба (BMS-663513).

[00415] SEQ ID NO:22 представляет собой легкую цепь моноклонального антитела-агониста 4-1BB урелумаба (BMS-663513).

[00416] SEQ ID NO:23 представляет собой вариабельную область тяжелой цепи (VH) для моноклонального антитела-агониста 4-1BB урелумаба (BMS-663513).

[00417] SEQ ID NO:24 представляет собой вариабельную область легкой цепи (VL)

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

[00418] SEQ ID NO:25 представляет собой CDR1 тяжелой цепи для моноклонального антитела-агониста 4-1BB урелумаба (BMS-663513).

[00419] SEQ ID NO:26 представляет собой CDR2 тяжелой цепи для моноклонального антитела-агониста 4-1BB урелумаба (BMS-663513).

[00420] SEQ ID NO:27 представляет собой CDR3 тяжелой цепи для моноклонального антитела-агониста 4-1BB урелумаба (BMS-663513).

[00421] SEQ ID NO:28 представляет собой CDR1 легкой цепи для моноклонального антитела-агониста 4-1BB урелумаба (BMS-663513).

[00422] SEQ ID NO:29 представляет собой CDR2 легкой цепи для моноклонального антитела-агониста 4-1BB урелумаба (BMS-663513).

[00423] SEQ ID NO:30 представляет собой CDR3 легкой цепи для моноклонального антитела-агониста 4-1BB урелумаба (BMS-663513).

[00424] SEQ ID NO:31 представляет собой Fc-домен слитого белка-агониста TNFRSF.

[00425] SEQ ID NO:32 представляет собой линкер слитого белка-агониста TNFRSF.

[00426] SEQ ID NO:33 представляет собой линкер слитого белка-агониста TNFRSF.

[00427] SEQ ID NO:34 представляет собой линкер слитого белка-агониста TNFRSF.

[00428] SEQ ID NO:35 представляет собой линкер слитого белка-агониста TNFRSF.

[00429] SEQ ID NO:36 представляет собой линкер слитого белка-агониста TNFRSF.

[00430] SEQ ID NO:37 представляет собой линкер слитого белка-агониста TNFRSF.

[00431] SEQ ID NO:38 представляет собой линкер слитого белка-агониста TNFRSF.

[00432] SEQ ID NO:39 представляет собой линкер слитого белка-агониста TNFRSF.

[00433] SEQ ID NO:40 представляет собой линкер слитого белка-агониста TNFRSF.

[00434] SEQ ID NO:41 представляет собой линкер слитого белка-агониста TNFRSF.

[00435] SEQ ID NO:42 представляет собой Fc-домен слитого белка-агониста TNFRSF.

[00436] SEQ ID NO:43 представляет собой линкер слитого белка-агониста TNFRSF.

[00437] SEQ ID NO:44 представляет собой линкер слитого белка-агониста TNFRSF.

[00438] SEQ ID NO:45 представляет собой линкер слитого белка-агониста TNFRSF.

[00439] SEQ ID NO:46 представляет собой аминокислотную последовательность лиганда 4-1BB (4-1BBL).

[00440] SEQ ID NO:47 представляет собой растворимую часть полипептида 4-1BBL.

[00441] SEQ ID NO:48 представляет собой вариабельную область тяжелой цепи (VH) антитела-агониста 4-1BB 4B4-1-1 версии 1.

[00442] SEQ ID NO:49 представляет собой вариабельную область легкой цепи (VL) антитела-агониста 4-1BB 4B4-1-1 версии 1.

[00443] SEQ ID NO:50 представляет собой вариабельную область тяжелой цепи (VH) антитела-агониста 4-1BB 4B4-1-1 версии 2.

[00444] SEQ ID NO:51 представляет собой вариабельную область легкой цепи (VL)

антитела-агониста 4-1BB 4B4-1-1 версии 2.

[00445] SEQ ID NO:52 представляет собой вариабельную область тяжелой цепи (VH) антитела-агониста 4-1BB H39E3-2.

[00446] SEQ ID NO:53 представляет собой вариабельную область легкой цепи (VL) антитела-агониста 4-1BB H39E3-2.

[00447] SEQ ID NO:54 представляет собой аминокислотную последовательность OX40 человека.

[00448] SEQ ID NO:55 представляет собой аминокислотную последовательность мышиного OX40.

[00449] SEQ ID NO:56 представляет собой тяжелую цепь моноклонального антитела-агониста OX40 таволиксизумаба (MEDI-0562).

[00450] SEQ ID NO:57 представляет собой легкую цепь моноклонального антитела-агониста OX40 таволиксизумаба (MEDI-0562).

[00451] SEQ ID NO:58 представляет собой вариабельную область тяжелой цепи (VH) для моноклонального антитела-агониста OX40 таволиксизумаба (MEDI-0562).

[00452] SEQ ID NO:59 представляет собой вариабельную область легкой цепи (VL) для моноклонального антитела-агониста OX40 таволиксизумаба (MEDI-0562).

[00453] SEQ ID NO:60 представляет собой CDR1 тяжелой цепи для моноклонального антитела-агониста OX40 таволиксизумаба (MEDI-0562).

[00454] SEQ ID NO:61 представляет собой CDR2 тяжелой цепи для моноклонального антитела-агониста OX40 таволиксизумаба (MEDI-0562).

[00455] SEQ ID NO:62 представляет собой CDR3 тяжелой цепи для моноклонального антитела-агониста OX40 таволиксизумаба (MEDI-0562).

[00456] SEQ ID NO:63 представляет собой CDR1 легкой цепи для моноклонального антитела-агониста OX40 таволиксизумаба (MEDI-0562).

[00457] SEQ ID NO:64 представляет собой CDR2 легкой цепи для моноклонального антитела-агониста OX40 таволиксизумаба (MEDI-0562).

[00458] SEQ ID NO:65 представляет собой CDR3 легкой цепи для моноклонального антитела-агониста OX40 таволиксизумаба (MEDI-0562).

[00459] SEQ ID NO:66 представляет собой тяжелую цепь моноклонального антитела-агониста OX40 11D4.

[00460] SEQ ID NO:67 представляет собой легкую цепь моноклонального антитела-агониста OX40 11D4.

[00461] SEQ ID NO:68 представляет собой вариабельную область тяжелой цепи (VH) для моноклонального антитела-агониста OX40 11D4.

[00462] SEQ ID NO:69 представляет собой вариабельную область легкой цепи (VL) для моноклонального антитела-агониста OX40 11D4.

[00463] SEQ ID NO:70 представляет собой CDR1 тяжелой цепи для моноклонального антитела-агониста OX40 11D4.

[00464] SEQ ID NO:71 представляет собой CDR2 тяжелой цепи для

моноклонального антитела-агониста OX40 11D4.

[00465] SEQ ID NO:72 представляет собой CDR3 тяжелой цепи для моноклонального антитела-агониста OX40 11D4.

[00466] SEQ ID NO:73 представляет собой CDR1 легкой цепи для моноклонального антитела-агониста OX40 11D4.

[00467] SEQ ID NO:74 представляет собой CDR2 легкой цепи для моноклонального антитела-агониста OX40 11D4.

[00468] SEQ ID NO:75 представляет собой CDR3 легкой цепи для моноклонального антитела-агониста OX40 11D4.

[00469] SEQ ID NO:76 представляет собой тяжелую цепь моноклонального антитела-агониста OX40 18D8.

[00470] SEQ ID NO:77 представляет собой легкую цепь моноклонального антитела-агониста OX40 18D8.

[00471] SEQ ID NO:78 представляет собой вариабельную область тяжелой цепи (VH) для моноклонального антитела-агониста OX40 18D8.

[00472] SEQ ID NO:79 представляет собой вариабельную область легкой цепи (VL) для моноклонального антитела-агониста OX40 18D8.

[00473] SEQ ID NO:80 представляет собой CDR1 тяжелой цепи для моноклонального антитела-агониста OX40 18D8.

[00474] SEQ ID NO:81 представляет собой CDR2 тяжелой цепи для моноклонального антитела-агониста OX40 18D8.

[00475] SEQ ID NO:82 представляет собой CDR3 тяжелой цепи для моноклонального антитела-агониста OX40 18D8.

[00476] SEQ ID NO:83 представляет собой CDR1 легкой цепи для моноклонального антитела-агониста OX40 18D8.

[00477] SEQ ID NO:84 представляет собой CDR2 легкой цепи для моноклонального антитела-агониста OX40 18D8.

[00478] SEQ ID NO:85 представляет собой CDR3 легкой цепи для моноклонального антитела-агониста OX40 18D8.

[00479] SEQ ID NO:86 представляет собой вариабельную область тяжелой цепи (VH) для моноклонального антитела-агониста OX40 Hu119-122.

[00480] SEQ ID NO:87 представляет собой вариабельную область легкой цепи (VL) для моноклонального антитела-агониста OX40 Hu119-122.

[00481] SEQ ID NO:88 представляет собой CDR1 тяжелой цепи для моноклонального антитела-агониста OX40 Hu119-122.

[00482] SEQ ID NO:89 представляет собой CDR2 тяжелой цепи для моноклонального антитела-агониста OX40 Hu119-122.

[00483] SEQ ID NO:90 представляет собой CDR3 тяжелой цепи для моноклонального антитела-агониста OX40 Hu119-122.

[00484] SEQ ID NO:91 представляет собой CDR1 легкой цепи для моноклонального

антитела-агониста OX40 Hu119-122.

[00485] SEQ ID NO:92 представляет собой CDR2 легкой цепи для моноклонального антитела-агониста OX40 Hu119-122.

[00486] SEQ ID NO:93 представляет собой CDR3 легкой цепи для моноклонального антитела-агониста OX40 Hu119-122.

[00487] SEQ ID NO:94 представляет собой вариабельную область тяжелой цепи (VH) для моноклонального антитела-агониста OX40 Hu106-222.

[00488] SEQ ID NO:95 представляет собой вариабельную область легкой цепи (VL) для моноклонального антитела-агониста OX40 Hu106-222.

[00489] SEQ ID NO:96 представляет собой CDR1 тяжелой цепи для моноклонального антитела-агониста OX40 Hu106-222.

[00490] SEQ ID NO:97 представляет собой CDR2 тяжелой цепи для моноклонального антитела-агониста OX40 Hu106-222.

[00491] SEQ ID NO:98 представляет собой CDR3 тяжелой цепи для моноклонального антитела-агониста OX40 Hu106-222.

[00492] SEQ ID NO:99 представляет собой CDR1 легкой цепи для моноклонального антитела-агониста OX40 Hu106-222.

[00493] SEQ ID NO:100 представляет собой CDR2 легкой цепи для моноклонального антитела-агониста OX40 Hu106-222.

[00494] SEQ ID NO:101 представляет собой CDR3 легкой цепи для моноклонального антитела-агониста OX40 Hu106-222.

[00495] SEQ ID NO:102 представляет собой аминокислотную последовательность лиганда OX40 (OX40L).

[00496] SEQ ID NO:103 представляет собой растворимую часть полипептида OX40L.

[00497] SEQ ID NO:104 представляет собой альтернативную растворимую часть полипептида OX40L.

[00498] SEQ ID NO:105 представляет собой вариабельную область тяжелой цепи (VH) для моноклонального антитела-агониста OX40 008.

[00499] SEQ ID NO:106 представляет собой вариабельную область легкой цепи (VL) для моноклонального антитела-агониста OX40 008.

[00500] SEQ ID NO:107 представляет собой вариабельную область тяжелой цепи (VH) для моноклонального антитела-агониста OX40 011.

[00501] SEQ ID NO:108 представляет собой вариабельную область легкой цепи (VL) для моноклонального антитела-агониста OX40 011.

[00502] SEQ ID NO:109 представляет собой вариабельную область тяжелой цепи (VH) для моноклонального антитела-агониста OX40 021.

[00503] SEQ ID NO:110 представляет собой вариабельную область легкой цепи (VL) для моноклонального антитела-агониста OX40 021.

[00504] SEQ ID NO:111 представляет собой вариабельную область тяжелой цепи (VH) для моноклонального антитела-агониста OX40 023.

[00505] SEQ ID NO:112 представляет собой вариабельную область легкой цепи (VL) для моноклонального антитела-агониста OX40 023.

[00506] SEQ ID NO:113 представляет собой вариабельную область тяжелой цепи (VH) для моноклонального антитела-агониста OX40.

[00507] SEQ ID NO:114 представляет собой вариабельную область легкой цепи (VL) для моноклонального антитела-агониста OX40.

[00508] SEQ ID NO:115 представляет собой вариабельную область тяжелой цепи (VH) для моноклонального антитела-агониста OX40.

[00509] SEQ ID NO:116 представляет собой вариабельную область легкой цепи (VL) для моноклонального антитела-агониста OX40.

[00510] SEQ ID NO:117 представляет собой вариабельную область тяжелой цепи (VH) для гуманизированного моноклонального антитела-агониста OX40.

[00511] SEQ ID NO:118 представляет собой вариабельную область тяжелой цепи (VH) для гуманизированного моноклонального антитела-агониста OX40.

[00512] SEQ ID NO:119 представляет собой вариабельную область легкой цепи (VL) для гуманизированного моноклонального антитела-агониста OX40.

[00513] SEQ ID NO:120 представляет собой вариабельную область легкой цепи (VL) для гуманизированного моноклонального антитела-агониста OX40.

[00514] SEQ ID NO:121 представляет собой вариабельную область тяжелой цепи (VH) для гуманизированного моноклонального антитела-агониста OX40.

[00515] SEQ ID NO:122 представляет собой вариабельную область тяжелой цепи (VH) для гуманизированного моноклонального антитела-агониста OX40.

[00516] SEQ ID NO:123 представляет собой вариабельную область легкой цепи (VL) для гуманизированного моноклонального антитела-агониста OX40.

[00517] SEQ ID NO:124 представляет собой вариабельную область легкой цепи (VL) для гуманизированного моноклонального антитела-агониста OX40.

[00518] SEQ ID NO:125 представляет собой вариабельную область тяжелой цепи (VH) для моноклонального антитела-агониста OX40.

[00519] SEQ ID NO:126 представляет собой вариабельную область легкой цепи (VL) для моноклонального антитела-агониста OX40.

Определения

[00520] Если не указано иное, все технические и научные термины, применяемые в настоящем документе, имеют значение, обычно понимаемое специалистом в области техники, к которой относится данное изобретение. Все патенты и публикации, упомянутые в настоящем документе, включены посредством ссылки в полном объеме.

[00521] Термин «*in vivo*» относится к явлению, которое происходит в организме субъекта.

[00522] Термин «*in vitro*» относится к явлению, которое происходит вне организма субъекта. Анализы in vitro охватывают анализы на клетках, в которых используются живые или мертвые клетки, и могут также включать бесклеточный анализ, в котором не

используются интактные клетки.

[00523] Термин «*ex vivo*» относится к явлению, которое включает лечение или проведение процедуры на клетке, ткани и/или органе, которые были взяты из организма субъекта. Клетка, ткань и/или орган могут быть надлежащим образом возвращены в организм субъекта в процессе хирургического вмешательства или лечения.

[00524] Термин «быстрая экспансия» означает увеличение количества антигенспецифических TIL по меньшей мере приблизительно в 3 раза (или 4, 5, 6, 7, 8 или 9 раз) за неделю, более предпочтительно по меньшей мере приблизительно в 10 раз (или 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 или 90 раз) за неделю или, наиболее предпочтительно, по меньшей мере приблизительно в 100 раз за неделю. Ниже описан ряд протоколов быстрой экспансии.

[00525] Под «опухоль-инфильтрирующими лимфоцитами» или «TIL» в настоящем документе подразумевается популяция клеток, первоначально полученных в виде белых кровяных телец, которые покинули кровоток субъекта и мигрировали в опухоль. TIL включают, не ограничиваясь перечисленным, цитотоксические $CD8^+$ Т-клетки (лимфоциты), Th1 и Th17 $CD4^+$ Т-клетки, естественных киллеров, дендритные клетки и макрофаги M1. TIL включают как первичные, так и вторичные TIL. «Первичные TIL» - это TIL, полученные из образцов ткани пациента, как описано в настоящем документе (иногда называемые «свежеполученными» или «свежевыделенными»), а «вторичные TIL» - это любые популяции TIL-клеток, которые были подвергнуты экспансии или пролиферации, как обсуждается в настоящем документе, включая, не ограничиваясь перечисленным, общие популяции TIL и подвергнутые экспансии TIL («REP TIL» или «TIL после REP»). Популяции TIL-клеток могут включать генетически модифицированные TIL.

[00526] Под «популяцией клеток» (включая TIL) в настоящем документе подразумевается ряд клеток, которые имеют общие признаки. Как правило, численность популяций обычно колеблется от 1×10^6 до 1×10^{10}, при этом разные популяции TIL имеют разную численность. Например, начальный рост первичных TIL в присутствии IL-2 приводит к популяции общей массы TIL численностью приблизительно 1×10^8 клеток. Экспансию REP обычно проводят для получения популяций из от $1,5 \times 10^9$ до $1,5 \times 10^{10}$ клеток для инфузии.

[00527] Под «криоконсервированными TIL» в настоящем документе подразумевается, что TIL, будь то первичные, общие или подвергнутые экспансии (REP TIL), обрабатывают и хранят в диапазоне от -150°C до -60 °C. Общие методы криоконсервации также описаны в других местах настоящего документа, в том числе в разделе примеров. Для ясности, «криоконсервированные TIL» отличаются от замороженных образцов ткани, которые можно применять в качестве источника первичных TIL.

[00528] Под «размороженными криоконсервированными TIL» в настоящем документе подразумевается популяция TIL, которые ранее были криоконсервированы, а затем обработаны для возврата к комнатной или более высокой температуре, включая, не ограничиваясь перечисленным, температуры культивирования клеток или температуры,

при которых TIL можно вводить пациенту.

[00529] TIL обычно могут быть определены биохимическими методами, с использованием маркеров клеточной поверхности, или функционально, по их способности инфильтрировать опухоли и осуществлять лечение. TIL обычно могут быть распределены по категориям по экспрессии одного или более из следующих биомаркеров: CD4, CD8, TCR αβ, CD27, CD28, CD56, CCR7, CD45Ra, CD95, PD-1 и CD25. Дополнительно и в качестве альтернативы, TIL могут быть функционально определены по их способности инфильтрировать солидные опухоли при повторном введении пациенту.

[00530] Термин «среды для криоконсервации» или «среда для криоконсервации» относится к любой среде, которая может быть использована для криоконсервации клеток. Такие среды могут включать среды, содержащие от 7% до 10% ДМСО (диметилсульфоксида). Примеры сред включают CryoStor CS10, Hyperthermasol, а также их комбинации. Термин «CS10» относится к среде для криоконсервации, полученной от Stemcell Technologies или от Biolife Solutions. Среда CS10 может упоминаться под торговым наименованием «CryoStor® CS10». Среда CS10 представляет собой среду без сыворотки и животных компонентов, содержащую ДМСО.

[00531] Термин «Т-клетки центральной памяти» относится к субпопуляции Т-клеток, которые у человека являются CD45R0+ и конститутивно экспрессируют CCR7 ($CCR7^{hi}$) и CD62L ($CD62^{hi}$). Поверхностный фенотип Т-клеток центральной памяти также включает TCR, CD3, CD127 (IL-7R) и IL-15R. Факторы транскрипции Т-клеток центральной памяти включают BCL-6, BCL-6B, MBD2 и BMI1. Т-клетки центральной памяти главным образом секретируют IL-2 и CD40L в качестве эффекторных молекул после стимуляции TCR. Т-клетки центральной памяти преобладают в компартменте CD4 крови, а у человека их концентрация пропорционально повышена в лимфатических узлах и миндалинах.

[00532] Термин «Т-клетки эффекторной памяти» относится к субпопуляции Т-клеток человека или млекопитающих, которые, подобно Т-клеткам центральной памяти, являются CD45R0+, но утратили конститутивную экспрессию CCR7 ($CCR7^{lo}$) и являются гетерогенными или низкими по экспрессии CD62L ($CD62L^{lo}$). Поверхностный фенотип Т-клеток центральной памяти также включает TCR, CD3, CD127 (IL-7R) и IL-15R. Факторы транскрипции Т-клеток центральной памяти включают BLIMP1. Т-клетки эффекторной памяти быстро секретируют высокие уровни воспалительных цитокинов после антигенной стимуляции, включая интерферон-γ, IL-4 и IL-5. Т-клетки эффекторной памяти преобладают в компартменте CD8 крови, а у человека их концентрация пропорционально повышена в легких, печени и кишечнике. CD8+ Т-клетки эффекторной памяти несут большие количества перфорина.

[00533] Термин «закрытая система» относится к системе, закрытой для внешней среды. Любая закрытая система, подходящая для способов культивирования клеток, может быть использована для способов согласно настоящему изобретению. Закрытые системы включают, например, закрытые G-контейнеры, но 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.

[00534] Термины «фрагментирование», «фрагмент» и «фрагментированный», применяемые в настоящем документе для описания процессов разрушения опухоли, включают методы механической фрагментации, такие как дробление, разрезание, деление и кускование опухолевой ткани, а также любой другой метод разрушения физической структуры опухолевой ткани.

[00535] Термины «мононуклеарные клетки периферической крови» и «МНПК» относятся к клетке периферической крови, имеющей круглое ядро, включая лимфоциты (Т-клетки, В-клетки, NK-клетки) и моноциты. При использовании в качестве антигенпрезентирующих клеток (МНПК представляют собой тип антигенпрезентирующей клетки) мононуклеарные клетки периферической крови предпочтительно представляют собой облученные аллогенные мононуклеарные клетки периферической крови.

[00536] Термины «лимфоциты периферической крови» и «PBL» относятся к Т-клеткам, подвергнутым экспансии из периферической крови. В некоторых вариантах осуществления PBL отделяют от цельной крови или продукта афереза от донора. В некоторых вариантах осуществления PBL отделяют от цельной крови или продукта афереза от донора путем положительного или отрицательного отбора по фенотипу Т-клеток, такому как фенотип Т-клеток CD3+ CD45+.

[00537] Термин «антитело к CD3» относится к антителу или его варианту, например, моноклональному антителу, включая человеческие, гуманизированные, химерные или мышиные антитела, которые направлены против рецептора CD3 в Т-клеточном антигенном рецепторе зрелых Т-клеток. Антитела к CD3 включают OKT-3, также известное как муромонаб. Антитела к CD3 также включают клон UHCT1, также известный как T3 и CD3ε. Другие антитела к CD3 включают, например, отеликсизумаб, теплизумаб и визилизумаб.

[00538] Термин «OKT-3» (также упоминаемый в настоящем документе как «OKT3») относится к моноклональному антителу или его биоаналогу или варианту, включая человеческие, гуманизированные, химерные или мышиные антитела, направленные против рецептора CD3 в Т-клеточном антигенном рецепторе зрелых Т-клеток, и включает коммерчески доступные формы, такие как OKT-3 (30 нг/мл, MACS GMP CD3 pure, Miltenyi Biotech, Inc., Сан-Диего, Калифорния, США) и муромонаб, или их варианты, консервативные аминокислотные замены, гликоформы или биоаналоги. Аминокислотные последовательности тяжелой и легкой цепей муромонаба приведены в таблице 1 (SEQ ID NO:1 и SEQ ID NO:2). Гибридома, способная продуцировать OKT-3, депонирована в Американской коллекции типовых культур под регистрационным номером ATCC CRL 8001. Гибридома, способная продуцировать OKT-3, также депонирована в Европейской коллекции аутентифицированных клеточных культур (ECACC) под номером по каталогу 86022706.

ТАБЛИЦА 1. Аминокислотные последовательности 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

[00539] Термин «IL-2» (также называемый в настоящем документе «IL2») относится к фактору роста Т-клеток, известному как интерлейкин 2, и включает все формы IL-2, включая формы человека и млекопитающих, их консервативные аминокислотные замены, гликоформы, биоаналоги и варианты. IL-2 описан, например, в источниках Nelson, *J. Immunol.* **2004,** *172,* 3983-88 и Malek, *Annu. Rev. Immunol.* **2008,** *26,* 453-79, содержание которых включено в настоящий документ посредством ссылки. Аминокислотная последовательность рекомбинантного IL-2 человека, подходящего для применения в изобретении, представлена в таблице 2 (SEQ ID NO:3). Например, термин IL-2 охватывает рекомбинантные формы IL-2 человека, такие как альдеслейкин (PROLEUKIN, коммерчески доступен от нескольких поставщиков в одноразовых флаконах с 22 миллионами МЕ на флакон), а также форму рекомбинантного IL-2, поставляемого на рынок компанией CellGenix, Inc., Портсмут, Нью-Гэмпшир, США (CELLGRO GMP) или ProSpec-Tany

TechnoGene Ltd., Ист Брунсвик, Нью-Джерси, США (№ по каталогу CYT-209-b), и другие коммерческие эквиваленты от других поставщиков. Альдеслейкин (дез-аланил-1, серин-125, IL-2 человека) представляет собой негликозилированную рекомбинантную форму IL-2 человека с молекулярной массой приблизительно 15 кДа. Аминокислотная последовательность альдеслейкина, подходящего для применения в изобретении, представлена в таблице 2 (SEQ ID NO:4). Термин IL-2 также охватывает пегилированные формы IL-2, как описано в настоящем документе, включая пролекарство пегилированного IL2 NKTR-214, доступное от Nektar Therapeutics, Южный Сан-Франциско, Калифорния, США. NKTR-214 и пегилированный IL-2, подходящие для применения в изобретении, описаны в публикации заявки на патент США US 2014/0328791 A1 и публикации международной патентной заявки WO 2012/065086 A1, содержание которых включено в настоящий документ посредством ссылки. Альтернативные формы конъюгированного IL-2, подходящие для применения в изобретении, описаны в патентах США №№ 4766106, 5206344, 5089261 и 4902502, содержание которых включено в настоящий документ посредством ссылки. Препараты IL-2, подходящие для применения в изобретении, описаны в патенте США № 6706289, содержание которого включено в настоящий документ посредством ссылки.

ТАБЛИЦА 2. Аминокислотные последовательности интерлейкинов.

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

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

[00540] Термин «IL-4» (также называемый в настоящем документе «IL4») относится к цитокину, известному как интерлейкин 4, который продуцируется Th2 Т-клетками и эозинофилами, базофилами и тучными клетками. IL-4 регулирует дифференцировку наивных хелперных Т-клеток (клеток Th0) в Th2 Т-клетки. Steinke and Borish, *Respir. Res.* **2001,** *2,* 66-70. После активации IL-4 Th2 Т-клетки впоследствии продуцируют дополнительный IL-4 в петле положительной обратной связи. IL-4 также стимулирует пролиферацию В-клеток и экспрессию MHC класса II, и вызывает переключение класса на экспрессию IgE и IgG_1 из В-клеток. Рекомбинантный IL-4 человека, подходящий для применения в изобретении, коммерчески доступен от нескольких поставщиков, включая ProSpec-Tany TechnoGene Ltd., Ист-Брунсвик, Нью-Джерси, США (№ по каталогу CYT-211) и ThermoFisher Scientific, Inc., Уолтем, Массачусетс, США (рекомбинантный белок IL-15 человека, № по каталогу Gibco CTP0043). Аминокислотная последовательность рекомбинантного IL-4 человека, подходящего для применения в изобретении, представлена в таблице 2 (SEQ ID NO:5).

[00541] Термин «IL-7» (также называемый в настоящем документе «IL7») 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. IL-7 может стимулировать развитие Т-клеток. IL-7 связывается с рецептором IL-7, гетеродимером, состоящим из альфа-цепи рецептора IL-7 и общей гамма-цепи рецептора, что приводит к серии сигналов, важных для развития Т-клеток в тимусе и выживания на периферии. Рекомбинантный IL-7 человека, подходящий для применения в изобретении, коммерчески доступен от нескольких поставщиков, включая ProSpec-Tany TechnoGene Ltd., Ист-Брунсвик, Нью-Джерси, США (№ по каталогу CYT-254) и ThermoFisher Scientific, Inc., Уолтем, Массачусетс, США (рекомбинантный белок IL-15 человека, № по каталогу Gibco PHC0071). Аминокислотная последовательность

рекомбинантного IL-7 человека, подходящего для применения в изобретении, представлена в таблице 2 (SEQ ID NO:6).

[00542] Термин «IL-15» (также называемый в настоящем документе «IL15») относится к фактору роста Т-клеток, известному как интерлейкин 15, и включает все формы IL-2, включая формы человека и млекопитающих, их консервативные аминокислотные замены, гликоформы, биоаналоги и варианты. IL-15 описан, например, в источнике Fehniger and Caligiuri, *Blood* **2001,** *97,* 14-32, содержание которого включено в настоящий документ посредством ссылки. IL-15 имеет общие субъединицы β и γ сигнального рецептора с IL-2. Рекомбинантный IL-15 человека представляет собой одиночную негликозилированную полипептидную цепь, содержащую 114 аминокислот (и N-концевой метионин) с молекулярной массой 12,8 кДа. Рекомбинантный IL-15 человека коммерчески доступен от нескольких поставщиков, включая ProSpec-Tany TechnoGene Ltd., Ист-Брунсвик, Нью-Джерси, США (№ по каталогу CYT-230-b) и ThermoFisher Scientific, Inc., Уолтем, Массачусетс, США (рекомбинантный белок IL-15 человека, № по каталогу 34-8159-82). Аминокислотная последовательность рекомбинантного IL-15 человека, подходящего для применения в изобретении, представлена в таблице 2 (SEQ ID NO:7).

[00543] Термин «IL-21» (также называемый в настоящем документе «IL21») относится к белку плейотропного цитокина, известному как интерлейкин 21, и включает все формы IL-21, включая формы человека и млекопитающих, их консервативные аминокислотные замены, гликоформы, биоаналоги и варианты. IL-21 описан, например, в источнике Spolski and Leonard, *Nat. Rev. Drug. Disc.* **2014,** *13,* 379-95, содержание которого включено в настоящий документ посредством ссылки. IL-21 в основном продуцируется естественными киллерными Т-клетками и активированными $CD4^+$ Т-клетками человека. Рекомбинантный IL-21 человека представляет собой одиночную негликозилированную полипептидную цепь, содержащую 132 аминокислоты с молекулярной массой 15,4 кДа. Рекомбинантный IL-21 человека коммерчески доступен от нескольких поставщиков, включая ProSpec-Tany TechnoGene Ltd., Ист-Брунсвик, Нью-Джерси, США (№ по каталогу CYT-408-b) и ThermoFisher Scientific, Inc., Уолтем, Массачусетс, США (рекомбинантный белок IL-21 человека, № по каталогу 14-8219-80). Аминокислотная последовательность рекомбинантного IL-21 человека, подходящего для применения в изобретении, представлена в таблице 2 (SEQ ID NO:8).

[00544] Когда указано «эффективное противоопухолевое количество», «эффективное количество, ингибирующее опухоль» или «терапевтическое количество», точное количество композиций согласно настоящему изобретению для введения может быть определено врачом с учетом индивидуальных различий в возрасте, массе тела, размере опухоли, степени инфекции или метастазирования и состояния пациента (субъекта). Как правило, можно утверждать, что фармацевтическая композиция, содержащая опухоль-инфильтрирующие лимфоциты (например, вторичные TIL или генетически модифицированные цитотоксические лимфоциты), описанная в настоящем документе, может быть введена 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), включая все целые значения в пределах этих диапазонов. Композиции, содержащие опухоль-инфильтрирующие лимфоциты (в том числе, в некоторых случаях, генетически модифицированные цитотоксические лимфоциты) также могут быть введены множество раз в этих дозировках. Опухоль-инфильтрирующие лимфоциты (в том числе, в некоторых случаях, генетически модифицированные) могут быть введены с использованием методов инфузии, которые широко известны в иммунотерапии (см., например, Rosenberg et al., *New Eng. J. of Med.* 319: 1676, 1988). Оптимальная дозировка и режим лечения для конкретного пациента могут быть легко определены специалистом в области медицины путем наблюдения за пациентом на предмет признаков заболевания и соответствующей корректировки лечения.

[00545] Термин «гематологическое злокачественное новообразование», «гематологическая злокачественная опухоль» или термины с соответствующим значением относятся к раковым заболеваниям и опухолям кроветворной и лимфоидной тканей млекопитающих, включая, не ограничиваясь перечисленным, ткани крови, костного мозга, лимфатических узлов и лимфатической системы. Гематологические злокачественные новообразования также называют «жидкими опухолями». Гематологические злокачественные новообразования включают, не ограничиваясь перечисленным, острый лимфобластный лейкоз (ОЛЛ), хроническую лимфоцитарную лимфому (ХЛЛ), мелкоклеточную лимфоцитарную лимфому (МЛЛ), острый миелогенный лейкоз (ОМЛ), хронический миелогенный лейкоз (ХМЛ), острый моноцитарный лейкоз (ОМоЛ), лимфому Ходжкина и неходжкинские лимфомы. Термин «В-клеточные гематологические злокачественные новообразования» относится к гематологическим злокачественным новообразованиям, поражающим В-клетки.

[00546] Термин «солидная опухоль» относится к нетипичной массе ткани, которая обычно не содержит кист или жидких участков. Солидные опухоли могут быть доброкачественными или злокачественными. Термин «солидная раковая опухоль» относится к злокачественным, неопластическим или раковидным солидным опухолям. Солидные раковые опухоли включает, не ограничиваясь перечисленным, саркомы, карциномы и лимфомы, такие как рак легкого, молочной железы, предстательной железы, ободочной кишки, прямой кишки и мочевого пузыря. Тканевая структура солидных опухолей включает взаимозависимые тканевые компартменты, включая паренхиму (раковые клетки) и поддерживающие стромальные клетки, в которых рассредоточены раковые клетки и которые могут обеспечивать поддерживающее микроокружение.

[00547] Термин «жидкая опухоль» относится к нетипичной массе клеток, которая имеет жидкую природу. Жидкие раковые опухоли включают, не ограничиваясь перечисленным, лейкозы, миеломы и лимфомы, а также другие гематологические злокачественные новообразования. TIL, полученные из жидких опухолей, могут также называться в настоящем документе лимфоцитами, инфильтрирующими костный мозг

(MIL). TIL, полученные из жидких опухолей, включая жидкие опухоли, циркулирующие в периферической крови, также могут называться в настоящем документе PBL. Термины MIL, TIL и PBL используются в настоящем документе взаимозаменяемо и различаются только в зависимости от типа ткани, из которой происходят клетки.

[00548] Термин «микроокружение» в контексте настоящего документа может относиться к микроокружению солидной или гематологической опухоли в целом или к отдельной подгруппе клеток в этом микроокружении. Микроокружение опухоли в контексте настоящего документа относится к сложной смеси «клеток, растворимых факторов, сигнальных молекул, внеклеточных матриц и механических стимулов, которые способствуют неопластической трансформации, поддерживают рост и инвазию опухоли, защищают опухоль от иммунитета хозяина, способствуют терапевтической резистентности и создают ниши для разрастания доминирующих метастазов», как описано в Swartz, *et al.*, *Cancer Res.*, **2012,** *72,* 2473. Несмотря на то, что опухоли экспрессируют антигены, которые должны распознаваться Т-клетками, элиминация опухоли иммунной системой происходит редко из-за подавления иммунного ответа микроокружением.

[00549] В одном из вариантов осуществления изобретение включает способ лечения рака с применением популяции TIL, в котором пациент предварительно получает немиелоаблативную химиотерапию перед инфузией TIL согласно изобретению. В некоторых вариантах осуществления может быть предоставлена популяция TIL, где пациент предварительно получал лечение немиелоаблативной химиотерапией перед инфузией TIL согласно настоящему изобретению. В одном из вариантов осуществления немиелоаблативная химиотерапия представляет собой циклофосфамид 60 мг/кг/сут в течение 2 дней (дни 27 и 26 перед инфузией TIL) и флударабин 25 мг/м2/сут в течение 5 дней (дни с 27 по 23 перед инфузией TIL). В одном из вариантов осуществления после немиелоаблативной химиотерапии и инфузии TIL (в день 0) согласно изобретению пациент получает внутривенную инфузию IL-2 в дозе 720 000 МЕ/кг раз в 8 часов до достижения физиологической толерантности.

[00550] Экспериментальные данные показывают, что лимфодеплеция до адоптивного переноса опухолеспецифических Т-лимфоцитов играет ключевую роль в повышении эффективности лечения за счет устранения регуляторных Т-клеток и конкурирующих элементов иммунной системы («поглотителей цитокинов»). Соответственно, в некоторых вариантах осуществления изобретения у пациента проводят этап лимфодеплеции (иногда также называемую «иммуносупрессивным кондиционированием») перед введением rTIL согласно изобретению.

[00551] Термины «совместное введение», «совместно вводить», «вводимый в комбинации с», «введение в комбинации с», «одновременное» и «параллельное» в контексте настоящего документа охватывают введение двух или более активных фармацевтических ингредиентов (в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, например, по меньшей мере одного агониста калиевых каналов в комбинации со множеством TIL) субъекту так, чтобы и активные фармацевтические

ингредиенты, и/или их метаболиты присутствовали в организме субъекта в одно и то же время. Совместное введение включает одновременное введение в отдельных композициях, введение в разное время в отдельных композициях или введение в композиции, в которой присутствуют два или более активных фармацевтических ингредиентов. Одновременное введение в отдельных композициях и введение в композиции, в которой присутствуют оба агента, являются предпочтительными.

[00552] Термин «эффективное количество» или «терапевтически эффективное количество» относится к такому количеству соединения или комбинации соединений, как описано в настоящем документе, которое является достаточным для осуществления предполагаемого применения, включая, не ограничиваясь перечисленным, лечение заболевания. Терапевтически эффективное количество может варьироваться в зависимости от предполагаемого применения (in vitro или in vivo) или субъекта и патологического состояния, подлежащего лечению (например, массы тела, возраста и пола субъекта), тяжести патологического состояния или способа введения. Этот термин также относится к дозе, которая будет вызывать определенный ответ в клетках-мишенях (например, снижение адгезии тромбоцитов и/или миграции клеток). Конкретная доза будет варьироваться в зависимости от конкретных выбранных соединений, режима дозирования, которого необходимо придерживаться, от того, вводится ли соединение в комбинации с другими соединениями, времени введения, ткани, в которую его вводят, и физической системы доставки, в которой переносится соединение.

[00553] Термины «лечение», «осуществление лечения», «лечить» и т. п. относятся к достижению желаемого фармакологического и/или физиологического эффекта. Эффект может быть профилактическим с точки зрения полного или частичного предупреждения заболевания или его симптома и/или может быть терапевтическим с точки зрения частичного или полного излечения от заболевания и/или нежелательного эффекта, связанного с заболеванием. «Лечение» в контексте настоящего документа охватывает любое лечение заболевания у млекопитающего, в частности, у человека, и включает: (a) предупреждение возникновения заболевания у субъекта, который может быть предрасположен к развитию заболевания, но у которого оно еще не было диагностировано; (b) подавление заболевания, т. е. остановку его развития или прогрессирования; и (c) облегчение заболевания, т. е. вызывание регресса заболевания и/или облегчение одного или более симптомов заболевания. «Лечение» также подразумевает доставку агента для обеспечения фармакологического эффекта даже при отсутствии заболевания или состояния. Например, «лечение» включает доставку композиции, которая может вызывать иммунный ответ или обеспечивать иммунитет в отсутствие патологического состояния, например, в случае вакцины.

[00554] Термин «гетерологичный» при использовании применительно к частям нуклеиновой кислоты или белка означает, что указанная нуклеиновая кислота или белок содержит две или более подпоследовательностей, которые не находятся в таких же отношениях друг с другом в природе. Например, нуклеиновую кислоту обычно получают

рекомбинантно, имея две или более последовательностей из неродственных генов, организованных для образования новой функциональной нуклеиновой кислоты, например, промотор из одного источника и кодирующую область из другого источника или кодирующие области из разных источников. Точно так же гетерологичный белок означает, что белок содержит две или более подпоследовательностей, которые не находятся в таких же отношениях друг с другом в природе (например, слитый белок).

[00555] Термины «идентичность последовательностей», «процент идентичности» и «процент идентичности последовательностей» (или их синонимы, например, «99% идентичность») в контексте двух или более нуклеиновых кислот или полипептидов относятся к двум или более последовательностям или подпоследовательностям, которые являются одинаковыми или имеют указанный процент одинаковых нуклеотидов или аминокислотных остатков при сравнении и выравнивании (с введением гэпов, если это необходимо) для максимального соответствия, не учитывая какие-либо консервативные аминокислотные замены в качестве части идентичности последовательностей. Процент идентичности может быть измерен с помощью программного обеспечения или алгоритмов для сравнения последовательностей, или путем визуальной проверки. В данной области техники известны различные алгоритмы и программное обеспечение, которые можно применять для выравнивания аминокислотных или нуклеотидных последовательностей. Подходящие программы для определения процента идентичности последовательностей включают, например, пакет программ BLAST, доступный на веб-сайте BLAST Национального центра биотехнологической информации правительства США. Сравнение двух последовательностей может быть осуществлено с использованием алгоритма BLASTN или BLASTP. BLASTN используется для сравнения последовательностей нуклеиновых кислот, а BLASTP используется для сравнения аминокислотных последовательностей. Другими общедоступными программами, которые можно использовать для выравнивания последовательностей, являются ALIGN, ALIGN-2 (Genentech, Южный Сан-Франциско, Калифорния) или MegAlign, доступный от DNASTAR. Специалист в данной области техники способен определить подходящие параметры для максимального выравнивания с помощью отдельно взятого программного обеспечения для выравнивания. В отдельных вариантах осуществления используются параметры программного обеспечения для выравнивания по умолчанию.

[00556] В контексте настоящего документа термин «вариант» охватывает, не ограничиваясь перечисленным, антитела или слитые белки, содержащие аминокислотную последовательность, которая отличается от аминокислотной последовательности референсного антитела посредством одной или более замен, делеций и/или добавлений в определенных положениях в аминокислотной последовательности референсного антитела или соседних с ними положениях. Вариант может содержать одну или более консервативных замен в своей аминокислотной последовательности по сравнению с аминокислотной последовательностью референсного антитела. Консервативные замены могут включать, например, замену схожим образом заряженных или незаряженных

аминокислот. Вариант сохраняет способность специфически связываться с антигеном референсного антитела. Термин «вариант» также включает пегилированные антитела или белки.

[00557] Под «опухоль-инфильтрирующими лимфоцитами» или «TIL» в настоящем документе подразумевается популяция клеток, первоначально полученных в виде белых кровяных телец, которые покинули кровоток субъекта и мигрировали в опухоль. TIL включают, не ограничиваясь перечисленным, цитотоксические $CD8^+$ Т-клетки (лимфоциты), Th1 и Th17 $CD4^+$ Т-клетки, естественных киллеров, дендритные клетки и макрофаги M1. TIL включают как первичные, так и вторичные TIL. «Первичные TIL» - это TIL, полученные из образцов ткани пациента, как описано в настоящем документе (иногда называемые «свежеполученными» или «свежевыделенными»), а «вторичные TIL» - это любые популяции TIL-клеток, которые были подвергнуты экспансии или пролиферации, как обсуждается в настоящем документе, включая, не ограничиваясь перечисленным, общие популяции TIL, подвергнутые экспансии TIL («REP TIL»), а также «reREP TIL», как обсуждается в настоящем документе. reREP TIL могут включать, например, TIL второй экспансии или TIL второй дополнительной экспансии (такие как, например, описанные на этапе D фиг. 27, включая TIL, называемые reREP TIL).

[00558] TIL обычно могут быть определены биохимическими методами, с использованием маркеров клеточной поверхности, или функционально, по их способности инфильтрировать опухоли и осуществлять лечение. TIL обычно могут быть распределены по категориям по экспрессии одного или более из следующих биомаркеров: CD4, CD8, TCR αβ, CD27, CD28, CD56, CCR7, CD45Ra, CD95, PD-1 и CD25. Дополнительно и в качестве альтернативы, TIL могут быть функционально определены по их способности инфильтрировать солидные опухоли при повторном введении пациенту. TIL могут дополнительно характеризоваться эффективностью - например, TIL могут считаться высокоэффективными, если, например, высвобождение интерферона (IFN) составляет более приблизительно 50 пг/мл, более приблизительно 100 пг/мл, более приблизительно 150 пг/мл или более приблизительно 200 пг/мл.

[00559] Термины «фармацевтически приемлемый носитель» или «фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество» подразумевают любые возможные растворители, дисперсионные среды, покрытия, антибактериальные и противогрибковые агенты, изотонические агенты и агенты, замедляющие всасывание, 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 любой обычный фармацевтически приемлемый носитель или фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество несовместимы с активным фармацевтическим ингредиентом, предполагается их использование в терапевтических композициях согласно изобретению. Дополнительные активные фармацевтические ингредиенты, такие как другие лекарственные средства, также могут быть включены в описанные композиции и способы.

[00560] Термины «приблизительно» и «примерно» означают в пределах статистически значимого диапазона значений. Такой диапазон может находиться в пределах порядка величины, предпочтительно в пределах 50%, более предпочтительно в пределах 20%, еще более предпочтительно в пределах 10% и даже более предпочтительно в пределах 5% от заданного значения или диапазона. Допустимое отклонение, охватываемое терминами «приблизительно» или «примерно», зависит от конкретной исследуемой системы и может быть легко оценено специалистом в данной области техники. Более того, в контексте настоящего документа термины «приблизительно» и «примерно» означают, что измерения, размеры, составы, параметры, формы и другие количества и характеристики не являются и не обязательно должны быть точными, но могут быть приблизительными и/или быть больше или меньше, по желанию, отражая допуски, коэффициенты пересчета, округление, погрешность измерения и т. п., а также другие факторы, известные специалистам в данной области техники. Как правило, измерение, размер, состав, параметр, форма или другая величина или характеристика являются «приблизительными» или «примерными», независимо от того, указано ли это явным образом. Следует отметить, что описанные конструкции могут использоваться в вариантах осуществления очень разных размеров, форм и измерений.

[00561] Переходные термины «содержащий», «состоящий по существу из» и «состоящий из» при использовании в прилагаемой формуле изобретения в исходной и измененной форме определяют объем пункта формулы изобретения в отношении того, какие неуказанные дополнительные элементы или этапы пункта формулы изобретения, если таковые имеются, исключены из объема пункта(ов) формулы изобретения. Термин «содержащий» рассматривается как включительный или неограничительный и не исключает каких-либо дополнительных, неперечисленных элементов, способов, этапов или материалов. Термин «состоящий из» исключает любой элемент, этап или материал, кроме указанных в пункте формулы изобретения, и, в последнем случае, примеси, обычно связанные с указанным материалом(ами). Термин «состоящий по существу из» ограничивает объем пункта формулы изобретения указанными элементами, этапми или материалом(ами), а также теми элементами, которые существенно не влияют на основную(ые) и новую(ые) характеристику(и) заявленного изобретения. Все описанные в настоящем документе композиции, способы и наборы, которые воплощают настоящее изобретение, в альтернативных вариантах осуществления могут быть более конкретно определены любым из переходных терминов «содержащий», «состоящий по существу из» и «состоящий из».

[00562] Термин «высокий по PD-1», или «PD-1high», или «PD-1^{high}» относится к высокому уровню экспрессии белка PD-1 клеткой, такой как, не ограничиваясь перечисленным, опухоль-инфильтрирующий лимфоцит или Т-клетка, относительно контрольной клетки здорового субъекта. В некоторых вариантах осуществления уровень экспрессии PD-1 определяют с использованием стандартного метода, известного специалистам в данной области техники, для измерения уровней белка, присутствующего

на клетке, такого как проточная цитометрия, сортировка клеток с активированной флуоресценцией (FACS), иммуноцитохимия и тому подобное. В некоторых случаях PD-1 high TIL экспрессирует более высокий уровень PD-1 по сравнению с иммунной клеткой здорового субъекта. В некоторых случаях популяция PD-1 high TIL экспрессирует более высокий уровень PD-1 по сравнению с популяцией иммунных клеток (например, мононуклеарных клеток периферической крови) здорового субъекта или группы здоровых субъектов. PD-1 high клетки могут называться PD-1-яркими клетками.

[00563] Термин «промежуточный по PD-1», или «PD-1int», или «PD-1^{int}» относится к промежуточному или умеренному уровню экспрессии белка PD-1 клеткой, такой как, не ограничиваясь перечисленным, опухоль-инфильтрирующий лимфоцит или Т-клетка, относительно контрольной клетки здорового субъекта. Например, PD-1int Т-клетка экспрессирует белок PD-1 на уровне или диапазоне, схожем с максимальным диапазоном белка PD-1, экспрессируемым контрольной клеткой (например, мононуклеарной клеткой периферической крови) от здорового субъекта, или по существу эквивалентным ему. Другими словами, PD-1int TIL имеет уровень экспрессии PD-1, схожий с фоновым уровнем экспрессии PD-1 контрольной иммунной клеткой от здорового субъекта, или по существу эквивалентный ему. PD-1int клетки могут называться PD-1-тусклыми клетками. Специалисту в данной области техники ясно, что положительный по PD-1 TIL может являться PD-1high TIL или PD-1int TIL.

[00564] Термин «отрицательный по PD-1», или «PD-1neg», или «PD-1^{neg}» относится к отрицательному или низкому уровню экспрессии белка PD-1 клеткой, такой как, не ограничиваясь перечисленным, опухоль-инфильтрирующий лимфоцит или Т-клетка, относительно контрольной клетки здорового субъекта. Например, PD-1neg Т-клетка не экспрессирует белок PD-1. В некоторых случаях PD-1neg Т-клетка экспрессирует белок PD-1 на уровне, схожем с минимальным уровнем белка PD-1, экспрессируемым контрольной клеткой (например, мононуклеарной клеткой периферической крови) от здорового субъекта, или по существу эквивалентным ему. PD-1neg лимфоциты могут экспрессировать PD-1 на том же уровне или в том же диапазоне, что и большинство лимфоцитов в контрольной популяции.

[00565] PD-1high, PD-1int и PD-1neg TIL представляют собой отдельные и разные субпопуляции TIL, подвергнутые экспансии ex vivo в соответствии со способами, описанными в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления популяция TIL, подвергнутых экспансии ex vivo, включает PD-1high TIL, PD-1int TIL и PD-1neg TIL.

Процессы производства TIL (варианты осуществления процессов GEN3, необязательно включая среды с определенным составом)

[00566] Не ограничиваясь какой-либо конкретной теорией, полагают, что примирующая первая экспансия, которая примирует активацию Т-клеток с последующей быстрой второй экспансией, которая усиливает активацию Т-клеток, как описано в способах согласно изобретению, позволяет получать подвергнутые экспансии Т-клетки, которые сохраняют «более молодой» фенотип, и как таковые подвергнутые экспансии Т-

клетки согласно изобретению должны проявлять более высокую цитотоксичность в отношении раковых клеток, чем Т-клетки, подвергнутые экспансии другими способами. В частности, полагают, что активация Т-клеток, которая примируется воздействием антитела к CD3 (например, OKT-3), IL-2 и, необязательно, антигенпрезентирующих клеток (АПК), а затем усиливается последующим воздействием дополнительного антитела к CD-3 (например, OKT-3), IL-2 и АПК, как указано в способах согласно изобретению, ограничивает или предотвращает созревание Т-клеток в культуре, обеспечивая в результате популяцию Т-клеток с менее зрелым фенотипом, которые меньше истощаются при экспансии в культуре и проявляют большую цитотоксичность в отношении раковых клеток. В некоторых вариантах осуществления этап быстрой второй экспансии разделен на множество этапов для достижения вертикального масштабирования культивирования посредством: (a) проведения быстрой второй экспансии путем культивирования Т-клеток в мелкомасштабной культуре в первом контейнере, например, контейнере G-REX 100MCS, в течение приблизительно от 3 до 4 дней, а затем (b) осуществления переноса Т-клеток в мелкомасштабной культуре во второй контейнер, большего размера, чем первый контейнер, например, контейнер G-REX 500MCS, и культивирование Т-клеток из мелкомасштабной культуры в более крупномасштабной культуре во втором контейнере в течение приблизительно от 4 до 7 дней. В некоторых вариантах осуществления этап быстрой экспансии разделен на множество этапов для достижения горизонтального масштабирования культивирования посредством: (a) проведения быстрой второй экспансии путем культивирования Т-клеток в первой мелкомасштабной культуре в первом контейнере, например, контейнере G-REX 100MCS, в течение приблизительно от 3 до 4 дней, а затем (b) осуществления переноса и распределения Т-клеток из первой мелкомасштабной культуры в и среди по меньшей мере 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 вторых контейнеров, которые равны по размеру первому контейнеру, где в каждом из вторых контейнеров часть Т-клеток из первой мелкомасштабной культуры, перенесенную в такой второй контейнер, культивируют во второй мелкомасштабной культуре в течение приблизительно от 4 до 7 дней. В некоторых вариантах осуществления этап быстрой экспансии разделен на множество этапов для достижения горизонтального и вертикального масштабирования культивирования посредством: (a) проведения быстрой второй экспансии путем культивирования Т-клеток в мелкомасштабной культуре в первом контейнере, например, контейнере G-REX 100MCS, в течение приблизительно от 3 до 4 дней, а затем (b) осуществления переноса и распределения Т-клеток из мелкомасштабной культуры в и среди по меньшей мере 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, контейнеров G-REX 500MCS, где в каждом из вторых контейнеров часть Т-клеток из мелкомасштабной культуры, перенесенную в такой второй контейнер, культивируют в более крупномасштабной культуре в течение приблизительно от 4 до 7 дней. В некоторых вариантах осуществления этап быстрой экспансии разделен на множество этапов для достижения горизонтального и вертикального масштабирования

культивирования посредством: (a) проведения быстрой второй экспансии путем культивирования Т-клеток в мелкомасштабной культуре в первом контейнере, например, контейнере G-REX 100MCS, в течение приблизительно 4 дней, а затем (b) осуществления переноса и распределения Т-клеток из мелкомасштабной культуры в и среди по меньшей мере 2, 3 или 4 вторых контейнеров, большего размера, чем первый контейнер, например, контейнеров G-REX 500MCS, где в каждом из вторых контейнеров часть Т-клеток из мелкомасштабной культуры, перенесенную в такой второй контейнер, культивируют в более крупномасштабной культуре в течение приблизительно 5 дней.

[00567] В некоторых вариантах осуществления быструю вторую экспансию проводят после того, как активация Т-клеток, вызванная примирующей первой экспансией, начинает уменьшаться, спадать, ослабевать или утихать.

[00568] В некоторых вариантах осуществления быструю вторую экспансию проводят после того, как активация Т-клеток, вызванная примирующей первой экспансией, уменьшилась на 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%.

[00569] В некоторых вариантах осуществления быструю вторую экспансию проводят после того, как активация Т-клеток, вызванная примирующей первой экспансией, уменьшилась на процент в диапазоне от 1% до 100%, или приблизительно в таком диапазоне.

[00570] В некоторых вариантах осуществления быструю вторую экспансию проводят после того, как активация Т-клеток, вызванная примирующей первой экспансией, уменьшилась на процент в диапазоне от 1% до 10%, от 10% до 20%, от 20% до 30%, от 30% до 40%, от 40% до 50%, от 50% до 60%, от 60% до 70%, от 70% до 80%, от 80% до 90% или от 90% до 100%, или приблизительно в таком диапазоне.

[00571] В некоторых вариантах осуществления быструю вторую экспансию проводят после того, как активация Т-клеток, вызванная примирующей первой экспансией, уменьшилась по меньшей мере на или приблизительно по меньшей мере 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%.

[00572] В некоторых вариантах осуществления быструю вторую экспансию проводят после того, как активация Т-клеток, вызванная примирующей первой экспансией, уменьшилась на вплоть до или приблизительно на вплоть 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%.

[00573] В некоторых вариантах осуществления уменьшение активации Т-клеток, вызванной примирующей первой экспансией, определяют по снижению количества интерферон-гамма, высвобождаемого Т-клетками в ответ на стимуляцию антигеном.

[00574] В некоторых вариантах осуществления примирующую первую экспансию Т-клеток проводят в течение вплоть до или приблизительно вплоть до 7 дней или приблизительно 8 дней.

[00575] В некоторых вариантах осуществления примирующую первую экспансию Т-клеток проводят в течение вплоть до или приблизительно вплоть до 1 дня, 2 дней, 3 дней, 4 дней, 5 дней, 6 дней, 7 дней или 8 дней.

[00576] В некоторых вариантах осуществления примирующую первую экспансию Т-клеток проводят в течение 1 дня, 2 дней, 3 дней, 4 дней, 5 дней, 6 дней, 7 дней или 8 дней.

[00577] В некоторых вариантах осуществления быструю вторую экспансию Т-клеток проводят в течение вплоть до или приблизительно вплоть до 11 дней.

[00578] В некоторых вариантах осуществления быструю вторую экспансию Т-клеток проводят в течение вплоть до или приблизительно вплоть до 1 дня, 2 дней, 3 дней, 4 дней, 5 дней, 6 дней, 7 дней, 8 дней, 9 дней, 10 дней или 11 дней.

[00579] В некоторых вариантах осуществления быструю вторую экспансию Т-клеток проводят в течение 1 дня, 2 дней, 3 дней, 4 дней, 5 дней, 6 дней, 7 дней, 8 дней, 9 дней, 10 дней или 11 дней.

[00580] В некоторых вариантах осуществления примирующую первую экспансию Т-клеток проводят в течение от или приблизительно от 1 дня до или приблизительно до 7 дней, и быструю вторую экспансию Т-клеток проводят в течение от или приблизительно от 1 дня до или приблизительно до 11 дней.

[00581] В некоторых вариантах осуществления примирующую первую экспансию Т-клеток проводят в течение вплоть до или приблизительно вплоть до 1 дня, 2 дней, 3 дней, 4 дней, 5 дней, 6 дней, 7 дней или 8 дней, и быструю вторую экспансию Т-клеток проводят в течение вплоть до или приблизительно вплоть до 1 дня, 2 дней, 3 дней, 4 дней, 5 дней, 6 дней, 7 дней, 8 дней, 9 дней, 10 дней или 11 дней.

[00582] В некоторых вариантах осуществления примирующую первую экспансию Т-клеток проводят в течение от или приблизительно от 1 дня до или приблизительно до 8 дней, и быструю вторую экспансию Т-клеток проводят в течение от или приблизительно от 1 дня до или приблизительно до 9 дней.

[00583] В некоторых вариантах осуществления примирующую первую экспансию Т-клеток проводят в течение 8 дней, и быструю вторую экспансию Т-клеток проводят в течение 9 дней.

[00584] В некоторых вариантах осуществления примирующую первую экспансию Т-клеток проводят в течение от или приблизительно от 1 дня до или приблизительно до 7 дней, и быструю вторую экспансию Т-клеток проводят в течение от или приблизительно от 1 дня до или приблизительно до 9 дней.

[00585] В некоторых вариантах осуществления примирующую первую экспансию Т-клеток проводят в течение 7 дней, и быструю вторую экспансию Т-клеток проводят в течение 9 дней.

[00586] В некоторых вариантах осуществления Т-клетки представляют собой опухоль-инфильтрирующие лимфоциты (TIL).

[00587] В некоторых вариантах осуществления Т-клетки представляют собой лимфоциты, инфильтрирующие костный мозг (MIL).

[00588] В некоторых вариантах осуществления Т-клетки представляют собой лимфоциты периферической крови (PBL).

[00589] В некоторых вариантах осуществления Т-клетки получены от донора, страдающего раком.

[00590] В некоторых вариантах осуществления Т-клетки представляют собой TIL, полученные из опухоли, удаленной у пациента, страдающего раком.

[00591] В некоторых вариантах осуществления Т-клетки представляют собой MIL, полученные из костного мозга пациента, страдающего гематологическим злокачественным новообразованием.

[00592] В некоторых вариантах осуществления Т-клетки представляют собой PBL, полученные из мононуклеарных клеток периферической крови (МНПК) от донора. В некоторых вариантах осуществления донор страдает раком. В некоторых вариантах осуществления донор страдает гематологическим злокачественным новообразованием.

[00593] В отдельных аспектах настоящего изобретения иммунные эффекторные клетки, например, Т-клетки, могут быть получены из единицы крови, взятой у субъекта, с использованием любого количества методов, известных специалисту в данной области техники, таких как разделение FICOLL. В одном предпочтительном аспекте клетки из циркулирующей крови индивидуума получают аферезом. Продукт афереза обычно содержит лимфоциты, включая Т-клетки, моноциты, гранулоциты, В-клетки, другие ядросодержащие лейкоциты, эритроциты и тромбоциты. В одном из аспектов клетки, собранные с помощью афереза, могут быть промыты для удаления фракции плазмы и, необязательно, для помещения клеток в подходящий буфер или среду для последующих этапов обработки. В одном из вариантов осуществления клетки промывают натрий-фосфатным буфером (PBS). В альтернативном варианте осуществления в промывочном растворе отсутствует кальций и может отсутствовать магний, или могут отсутствовать многие, если не все двухвалентные катионы. В одном из аспектов Т-клетки выделяют из лимфоцитов периферической крови путем лизиса эритроцитов и обеднения моноцитами, например, центрифугированием в градиенте PERCOLL или проточным элютриационным центрифугированием.

[00594] В некоторых вариантах осуществления Т-клетки представляют собой PBL, отделенные от цельной крови или продукта афереза, обогащенного лимфоцитами, от донора. В некоторых вариантах осуществления донор страдает раком. В некоторых вариантах осуществления донор страдает раком. В некоторых вариантах осуществления рак

выбран из группы, состоящей из меланомы, рака яичника, рака шейки матки, немелкоклеточного рака легкого (НМРЛ), рака легкого, рака мочевого пузыря, рака молочной железы, рака, вызванного вирусом папилломы человека, рака головы и шеи (включая плоскоклеточную карциному головы и шеи (ПКГШ)), глиобластомы (включая GBM), рака желудочно-кишечного тракта, рака почки и почечно-клеточной карциномы. В некоторых вариантах осуществления рак выбран из группы, состоящей из меланомы, рака яичника, рака шейки матки, немелкоклеточного рака легкого (НМРЛ), рака легкого, рака мочевого пузыря, рака молочной железы, рака, вызванного вирусом папилломы человека, рака головы и шеи (включая плоскоклеточную карциному головы и шеи (ПКГШ)), глиобластомы (включая GBM), рака желудочно-кишечного тракта, рака почки и почечно-клеточной карциномы. В некоторых вариантах осуществления донор страдает опухолью. В некоторых вариантах осуществления опухоль представляет собой жидкую опухоль. В некоторых вариантах осуществления опухоль представляет собой солидную опухоль. В некоторых вариантах осуществления донор страдает гематологическим злокачественным новообразованием.

[00595] В отдельных аспектах настоящего изобретения иммунные эффекторные клетки, например, Т-клетки, могут быть получены из единицы крови, взятой у субъекта, с использованием любого количества методов, известных специалисту в данной области техники, таких как разделение FICOLL. В одном предпочтительном аспекте клетки из циркулирующей крови индивидуума получают аферезом. Продукт афереза обычно содержит лимфоциты, включая Т-клетки, моноциты, гранулоциты, В-клетки, другие ядросодержащие лейкоциты, эритроциты и тромбоциты. В одном из аспектов клетки, собранные с помощью афереза, могут быть промыты для удаления фракции плазмы и, необязательно, для помещения клеток в подходящий буфер или среду для последующих этапов обработки. В одном из вариантов осуществления клетки промывают натрий-фосфатным буфером (PBS). В альтернативном варианте осуществления в промывочном растворе отсутствует кальций и может отсутствовать магний, или могут отсутствовать многие, если не все двухвалентные катионы. В одном из аспектов Т-клетки выделяют из лимфоцитов периферической крови путем лизиса эритроцитов и обеднения моноцитами, например, центрифугированием в градиенте PERCOLL или проточным элютриационным центрифугированием.

[00596] В некоторых вариантах осуществления Т-клетки представляют собой PBL, отделенные от цельной крови или продукта афереза, обогащенного лимфоцитами, от донора. В некоторых вариантах осуществления донор страдает раком. В некоторых вариантах осуществления рак выбран из группы, состоящей из меланомы, рака яичника, рака шейки матки, немелкоклеточного рака легкого (НМРЛ), рака легкого, рака мочевого пузыря, рака молочной железы, рака, вызванного вирусом папилломы человека, рака головы и шеи (включая плоскоклеточную карциному головы и шеи (ПКГШ)), глиобластомы (включая GBM), рака желудочно-кишечного тракта, рака почки и почечно-клеточной карциномы. В некоторых вариантах осуществления рак выбран из группы,

состоящей из меланомы, рака яичника, рака шейки матки, немелкоклеточного рака легкого (НМРЛ), рака легкого, рака мочевого пузыря, рака молочной железы, рака, вызванного вирусом папилломы человека, рака головы и шеи (включая плоскоклеточную карциному головы и шеи (ПКГШ)), глиобластомы (включая GBM), рака желудочно-кишечного тракта, рака почки и почечно-клеточной карциномы. В некоторых вариантах осуществления донор страдает опухолью. В некоторых вариантах осуществления опухоль представляет собой жидкую опухоль. В некоторых вариантах осуществления опухоль представляет собой солидную опухоль. В некоторых вариантах осуществления донор страдает гематологическим злокачественным новообразованием. В некоторых вариантах осуществления PBL выделяют из цельной крови или продукта афереза, обогащенного лимфоцитами, с использованием методов положительного или отрицательного отбора, т. е. удаления PBL с использованием маркера(ов), например, CD3+ CD45+, по фенотипу Т-клеток, или удаления клеток, не имеющих фенотипа Т-клеток, оставляя PBL. В других вариантах осуществления PBL выделяют градиентным центрифугированием. После выделения PBL из донорской ткани может быть инициирована примирующая первая экспансия PBL путем высевания подходящего количества выделенных PBL (в некоторых вариантах осуществления приблизительно 1×10^7 PBL) в культуру примирующей первой экспансии в соответствии с этапом примирующей первой экспансии любого из описанных в настоящем документе способов.

[00597] Иллюстративный процесс TIL, известный как процесс 3 (также называемый в настоящем документе GEN3), характеризующийся некоторыми из этих признаков, изображен на фиг. 1 (в частности, например, на фиг. 1B), и некоторые из преимуществ этого варианта осуществления настоящего изобретения по сравнению с процессом 2A описаны на фиг. 1, 2, 30 и 31 (в частности, например, фиг. 1B). Два варианта осуществления процесса 3 показаны на фиг. 1 и 30 (в частности, например, фиг. 1B). Процесс 2A или Gen 2 также описан в публикации патента США № 2018/0280436, включенной в настоящий документ посредством ссылки в полном объеме. Процесс Gen 3 также описан в заявке USSN 62/755,954, поданной 5 ноября 2018 г. (116983-5045-PR).

[00598] Как обсуждается и в общем описано в настоящем документе, TIL берут из образца, взятого у пациента, и подвергают обработке для увеличения их количества перед трансплантацией пациенту, с использованием процесса экспансии TIL, описанного в настоящем документе и называемого Gen 3. В некоторых вариантах осуществления TIL необязательно могут быть генетически модифицированы, как обсуждается ниже. В некоторых вариантах осуществления TIL могут быть криоконсервированы до или после экспансии. После размораживания они также могут быть рестимулированы для увеличения их метаболизма перед инфузией пациенту.

[00599] В некоторых вариантах осуществления примирующая первая экспансия (включая процессы, называемые в настоящем документе пред-быстрой экспансией (Pre-REP), а также процессы, показанные на фиг. 1 (в частности, например, фиг. 1B и/или фиг. 1C) как этап B) сокращена до 1-8 дней, а быстрая вторая экспансия (включая процессы,

называемые в настоящем документе протоколом быстрой экспансии (REP), а также процессы, показанные на фиг. 1 (в частности, например, фиг. 1B и/или фиг. 1C) как этап D) сокращена до 1-9 дней, как подробно обсуждается ниже, а также в разделе примеров и на фигурах. В некоторых вариантах осуществления примирующая первая экспансия (включая процессы, называемые в настоящем документе пред-быстрой экспансией (Pre-REP), а также процессы, показанные на фиг. 1 (в частности, например, фиг. 1B и/или фиг. 1C) как этап B) сокращена до 1-8 дней, а быстрая вторая экспансия (включая процессы, называемые в настоящем документе протоколом быстрой экспансии (REP), а также процессы, показанные на фиг. 1 (в частности, например, фиг. 1B и/или фиг. 1C) как этап D) сокращена до 1-8 дней, как подробно обсуждается ниже, а также в разделе примеров и на фигурах. В некоторых вариантах осуществления примирующая первая экспансия (включая процессы, называемые в настоящем документе пред-быстрой экспансией (Pre-REP), а также процессы, показанные на фиг. 1 (в частности, например, фиг. 1B и/или фиг. 1C) как этап B) сокращена до 1-7 дней, а быстрая вторая экспансия (включая процессы, называемые в настоящем документе протоколом быстрой экспансии (REP), а также процессы, показанные на фиг. 1 (в частности, например, фиг. 1B и/или фиг. 1C) как этап D) сокращена до 1-9 дней, как подробно обсуждается ниже, а также в разделе примеров и на фигурах. В некоторых вариантах осуществления примирующая первая экспансия (включая процессы, называемые в настоящем документе пред-быстрой экспансией (Pre-REP), а также процессы, показанные на фиг. 1 (в частности, например, фиг. 1B и/или фиг. 1C) как этап B) составляет 1-7 дней, а быстрая вторая экспансия (включая процессы, называемые в настоящем документе протоколом быстрой экспансии (REP), а также процессы, показанные на фиг. 1 (в частности, например, фиг. 1B и/или фиг. 1C) как этап D) составляет 1-10 дней, как подробно обсуждается ниже, а также в разделе примеров и на фигурах. В некоторых вариантах осуществления примирующая первая экспансия (например, экспансия, описанная как этап B на фиг. 1 (в частности, например, фиг. 1B и/или фиг. 1C)) сокращена до 8 дней, и быстрая вторая экспансия (например, экспансия, как описано на этапе D на фиг. 1 (в частности, например, фиг. 1B и/или фиг. 1C)) составляет 7-9 дней. В некоторых вариантах осуществления примирующая первая экспансия (например, экспансия, описанная как этап B на фиг. 1 (в частности, например, фиг. 1B и/или фиг. 1C)) составляет 8 дней, и быстрая вторая экспансия (например, экспансия, как описано на этапе D на фиг. 1 (в частности, например, фиг. 1B и/или фиг. 1C)) составляет 8-9 дней. В некоторых вариантах осуществления примирующая первая экспансия (например, экспансия, описанная как этап B на фиг. 1 (в частности, например, фиг. 1B и/или фиг. 1C)) сокращена до 7 дней, и быстрая вторая экспансия (например, экспансия, как описано на этапе D на фиг. 1 (в частности, например, фиг. 1B и/или фиг. 1C)) составляет 7-8 дней. В некоторых вариантах осуществления примирующая первая экспансия (например, экспансия, описанная как этап B на фиг. 1 (в частности, например, фиг. 1B и/или фиг. 1C)) сокращена до 8 дней, и быстрая вторая экспансия (например, экспансия, как описано на этапе D на фиг. 1 (в частности, например, фиг. 1B и/или фиг. 1C)) составляет 8 дней. В некоторых вариантах

осуществления примирующая первая экспансия (например, экспансия, описанная как этап B на фиг. 1 (в частности, например, фиг. 1B и/или фиг. 1C)) составляет 8 дней, и быстрая вторая экспансия (например, экспансия, как описано на этапе D на фиг. 1 (в частности, например, фиг. 1B и/или фиг. 1C)) составляет 9 дней. В некоторых вариантах осуществления примирующая первая экспансия (например, экспансия, описанная как этап B на фиг. 1 (в частности, например, фиг. 1B и/или фиг. 1C)) составляет 8 дней, и быстрая вторая экспансия (например, экспансия, как описано на этапе D на фиг. 1 (в частности, например, фиг. 1B и/или фиг. 1C)) составляет 10 дней. В некоторых вариантах осуществления примирующая первая экспансия (например, экспансия, описанная как этап B на фиг. 1 (в частности, например, фиг. 1B и/или фиг. 1C)) составляет 7 дней, и быстрая вторая экспансия (например, экспансия, как описано на этапе D на фиг. 1 (в частности, например, фиг. 1B и/или фиг. 1C)) составляет 7-10 дней. В некоторых вариантах осуществления примирующая первая экспансия (например, экспансия, описанная как этап B на фиг. 1 (в частности, например, фиг. 1B и/или фиг. 1C)) составляет 7 дней, и быстрая вторая экспансия (например, экспансия, как описано на этапе D на фиг. 1 (в частности, например, фиг. 1B и/или фиг. 1C)) составляет 8-10 дней. В некоторых вариантах осуществления примирующая первая экспансия (например, экспансия, описанная как этап B на фиг. 1 (в частности, например, фиг. 1B и/или фиг. 1C)) составляет 7 дней, и быстрая вторая экспансия (например, экспансия, как описано на этапе D на фиг. 1 (в частности, например, фиг. 1B и/или фиг. 1C)) составляет 9-10 дней. В некоторых вариантах осуществления примирующая первая экспансия (например, экспансия, описанная как этап B на фиг. 1 (в частности, например, фиг. 1B и/или фиг. 1C)) сокращена до 7 дней, и быстрая вторая экспансия (например, экспансия, как описано на этапе D на фиг. 1 (в частности, например, фиг. 1B и/или фиг. 1C)) составляет 7-9 дней. В некоторых вариантах осуществления комбинация примирующей первой экспансии и быстрой второй экспансии (например, экспансии, описанные как этап B и этап D на фиг. 1 (в частности, например, фиг. 1B и/или фиг. 1C)) составляет 14-16 дней, как подробно обсуждается ниже, а также в разделе примеров и на фигурах. В частности, считается, что отдельные варианты осуществления настоящего изобретения включают этап примирующей первой экспансии, на которой TIL активируются воздействием антитела к CD3, например, OKT-3, в присутствии IL-2, или воздействием антигена в присутствии по меньшей мере IL-2 и антитела к CD3, например, OKT-3. В отдельных вариантах осуществления TIL, которые активируются на этапе примирующей первой экспансии, как описано выше, представляют собой первую популяцию TIL, т. е. представляющих собой первичную популяцию клеток.

[00600] Приведенные ниже обозначения «этап» A, B, C и т. д. относятся к неограничивающему примеру на фиг. 1 (в частности, например, фиг. 1B и/или фиг. 1C) и относятся к отдельным неограничивающим вариантам осуществления, описанным в настоящем документе. Порядок проведения этапов ниже и на фиг. 1 (в частности, например, фиг. 1B и/или фиг. 1C) является иллюстративным, и настоящей заявкой и раскрытыми в настоящем документе способами предусмотрены любая комбинация или порядок этапов, а

также дополнительные этапы, повторение этапов и/или пропуск этапов.

ЭТАП А. Получение образца опухоли пациента

[00601] Как правило, TIL первоначально получают из образца опухоли пациента («первичные TIL») или из циркулирующих лимфоцитов, таких как лимфоциты периферической крови, включая лимфоциты периферической крови, обладающие TIL-подобными характеристиками, а затем подвергают экспансии до более крупной популяции для дальнейших манипуляций, как описано в настоящем документе, необязательно криоконсервируют и необязательно оценивают на фенотип и метаболические параметры как показатель здоровья TIL.

[00602] Образец опухоли пациента может быть получен с использованием способов, известных в данной области техники, обычно с помощью хирургической резекции, пункционной биопсии или других средств для получения образца, содержащего смесь опухолевых и TIL-клеток. Как правило, образец опухоли может быть взят из любой солидной опухоли, включая первичные опухоли, инвазивные опухоли или метастатические опухоли. Образец опухоли также может представлять собой жидкую опухоль, такую как опухоль, образовавшаяся вследствие гематологического злокачественного новообразования. Солидная опухоль может относиться к любому типу рака, включая, не ограничиваясь перечисленным, рак молочной железы, поджелудочной железы, предстательной железы, колоректальный рак, рак легкого, головного мозга, почки, желудка и кожи (включая, не ограничиваясь перечисленным, плоскоклеточную карциному, базальноклеточную карциному и меланому). В некоторых вариантах осуществления рак выбран из рака шейки матки, рака головы и шеи (включая, например, плоскоклеточную карциному головы и шеи (ПКГШ)), глиобластомы (GBM), рака желудочно-кишечного тракта, рака яичника, саркомы, рака поджелудочной железы, рака мочевого пузыря, рака молочной железы, трижды негативного рака молочной железы и немелкоклеточного рака легкого. В некоторых вариантах осуществления подходящие TIL получают из меланомных злокачественных опухолей, поскольку сообщалось, что они имеют особенно высокие уровни TIL.

[00603] После получения образец опухоли обычно фрагментируют с помощью острой диссекции на мелкие кусочки от 1 до приблизительно 8 $мм^3$, причем особенно подходящим является размер приблизительно 2-3 $мм^3$. TIL культивируют из этих фрагментов с использованием ферментативных гидролизатов опухолей. Такие гидролизаты опухолей могут быть получены путем инкубации в ферментных средах (например, буфер Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640, 2 мМ глутамата, 10 мкг/мл гентамицина, 30 единиц/мл ДНКазы и 1,0 мг/мл коллагеназы) с последующей механической диссоциацией (например, с использованием гомогенизатора ткани). Гидролизаты опухолей могут быть получены путем помещения опухоли в ферментную среду и механической диссоциации опухоли в течение примерно 1 минуты с последующей инкубацией в течение 30 минут при 37°C в 5% CO_2 с последующими повторными циклами механической диссоциации и инкубации при вышеуказанных условиях, пока не будут присутствовать только небольшие

кусочки ткани. По окончании этого процесса, если клеточная суспензия содержит большое количество эритроцитов или мертвых клеток, для удаления этих клеток может быть проведено разделение в градиенте плотности с использованием разветвленного гидрофильного полисахарида FICOLL. Можно применять альтернативные методы, известные в данной области техники, такие как описанные в публикации заявки на патент США № 2012/0244133 A1, содержание которой включено в настоящий документ посредством ссылки. Любой из вышеперечисленных методов может быть использован в любом из вариантов осуществления, описанных в настоящем документе, для способов экспансии TIL или способов лечения рака.

[00604] Как указано выше, в некоторых вариантах осуществления TIL получены из солидных опухолей. В некоторых вариантах осуществления солидные опухоли не фрагментируют. В некоторых вариантах осуществления солидные опухоли не фрагментируют и подвергают ферментативному гидролизу в виде цельных опухолей. В некоторых вариантах осуществления опухоли гидролизуют в смеси ферментов, содержащей коллагеназу, ДНКазу и гиалуронидазу. В некоторых вариантах осуществления опухоли гидролизуют в смеси ферментов, содержащей коллагеназу, ДНКазу и гиалуронидазу, в течение 1-2 часов. В некоторых вариантах осуществления опухоли гидролизуют в смеси ферментов, содержащей коллагеназу, ДНКазу и гиалуронидазу, в течение 1-2 часов при 37 °C, 5% CO_2. В некоторых вариантах осуществления опухоли гидролизуют в смеси ферментов, содержащей коллагеназу, ДНКазу и гиалуронидазу, в течение 1-2 часов при 37 °C, 5% CO_2 при вращении. В некоторых вариантах осуществления опухоли гидролизуют в течение ночи при непрерывном вращении. В некоторых вариантах осуществления опухоли гидролизуют в течение ночи при 37 °C, 5% CO_2 при непрерывном вращении.В некоторых вариантах осуществления цельную опухоль объединяют с ферментами с образованием реакционной смеси для гидролиза опухоли.

[00605] В некоторых вариантах осуществления опухоль восстанавливают с помощью лиофилизированных ферментов в стерильном буфере. В некоторых вариантах осуществления буфер представляет собой стерильный HBSS.

[00606] В некоторых вариантах осуществления смесь ферментов содержит коллагеназу. В некоторых вариантах осуществления коллагеназа представляет собой коллагеназу IV. В некоторых вариантах осуществления рабочий исходный раствор коллагеназы представляет собой 10X рабочий исходный раствор 100 мг/мл.

[00607] В некоторых вариантах осуществления смесь ферментов содержит ДНКазу. В некоторых вариантах осуществления рабочий исходный раствор ДНКазы представляет собой 10X рабочий исходный раствор 10000 МЕ/мл.

[00608] В некоторых вариантах осуществления смесь ферментов содержит гиалуронидазу. В некоторых вариантах осуществления рабочий исходный раствор гиалуронидазы представляет собой 10X рабочий исходный раствор 10 мг/мл.

[00609] В некоторых вариантах осуществления смесь ферментов содержит 10 мг/мл коллагеназы, 1000 МЕ/мл ДНКазы и 1 мг/мл гиалуронидазы.

[00610] В некоторых вариантах осуществления смесь ферментов содержит 10 мг/мл коллагеназы, 500 МЕ/мл ДНКазы и 1 мг/мл гиалуронидазы.

[00611] В некоторых вариантах осуществления смесь ферментов содержит приблизительно 10 мг/мл коллагеназы, приблизительно 1000 МЕ/мл ДНКазы и приблизительно 1 мг/мл гиалуронидазы.

[00612] В общем клеточная суспензия, полученная из опухоли, называется «первичной популяцией клеток», или «свежеполученной», или «свежевыделенной» популяцией клеток. В отдельных вариантах осуществления свежеполученную популяцию клеток TIL подвергают воздействию среды для культивирования клеток, содержащей антигенпрезентирующие клетки, IL-12 и OKT-3.

[00613] В некоторых вариантах осуществления фрагментация включает физическую фрагментацию, включая, например, диссекцию, а также ферментативный гидролиз. В некоторых вариантах осуществления фрагментация представляет собой физическую фрагментацию. В некоторых вариантах осуществления фрагментация представляет собой диссекцию. В некоторых вариантах осуществления фрагментацию осуществляют путем ферментативного гидролиза. В некоторых вариантах осуществления TIL могут быть первоначально культивированы из ферментативных гидролизатов опухолей и фрагментов опухолей, полученных от пациентов. В одном из вариантов осуществления TIL могут быть первоначально культивированы из ферментативных гидролизатов опухолей и фрагментов опухолей, полученных от пациентов.

[00614] В некоторых вариантах осуществления, когда опухоль представляет собой солидную опухоль, опухоль подвергают физической фрагментации после получения образца опухоли, например, на этапе A (как показано на фиг. 1 (в частности, например, фиг. 1B и/или фиг. 1C)). В некоторых вариантах осуществления фрагментация происходит до криоконсервации. В некоторых вариантах осуществления фрагментация происходит после криоконсервации. В некоторых вариантах осуществления фрагментация происходит после получения опухоли и в отсутствие какой-либо криоконсервации. В некоторых вариантах осуществления этап фрагментации представляет собой процесс, осуществляемый *in vitro* или *ex vivo*. В некоторых вариантах осуществления опухоль фрагментируют и 10, 20, 30, 40 или более фрагментов или кусочков помещают в каждый контейнер для примирующей первой экспансии. В некоторых вариантах осуществления опухоль фрагментируют и 30 или 40 фрагментов или кусочков помещают в каждый контейнер для примирующей первой экспансии. В некоторых вариантах осуществления опухоль фрагментируют и 40 фрагментов или кусочков помещают в каждый контейнер для примирующей первой экспансии. В некоторых вариантах осуществления множество фрагментов включает от приблизительно 4 до приблизительно 50 фрагментов, где каждый фрагмент имеет объем приблизительно 27 $мм^3$. В некоторых вариантах осуществления множество фрагментов включает от приблизительно 30 до приблизительно 60 фрагментов с общим объемом от приблизительно 1300 $мм^3$ до приблизительно 1500 $мм^3$. В некоторых вариантах осуществления множество фрагментов включает приблизительно 50 фрагментов с общим

объемом приблизительно 1350 мм^3. В некоторых вариантах осуществления множество фрагментов включает приблизительно 50 фрагментов с общей массой от приблизительно 1 грамма до приблизительно 1,5 граммов. В некоторых вариантах осуществления множество фрагментов включает приблизительно 4 фрагмента.

[00615] В некоторых вариантах осуществления TIL получают из фрагментов опухоли. В некоторых вариантах осуществления фрагмент опухоли получают путем острой диссекции. В некоторых вариантах осуществления фрагмент опухоли составляет приблизительно от 1 мм^3 до 10 мм^3. В некоторых вариантах осуществления фрагмент опухоли составляет приблизительно от 1 мм^3 до 8 мм^3. В некоторых вариантах осуществления фрагмент опухоли составляет приблизительно 1 мм^3. В некоторых вариантах осуществления фрагмент опухоли составляет приблизительно 2 мм^3. В некоторых вариантах осуществления фрагмент опухоли составляет приблизительно 3 мм^3. В некоторых вариантах осуществления фрагмент опухоли составляет приблизительно 4 мм^3. В некоторых вариантах осуществления фрагмент опухоли составляет приблизительно 5 мм^3. В некоторых вариантах осуществления фрагмент опухоли составляет приблизительно 6 мм^3. В некоторых вариантах осуществления фрагмент опухоли составляет приблизительно 7 мм^3. В некоторых вариантах осуществления фрагмент опухоли составляет приблизительно 8 мм^3. В некоторых вариантах осуществления фрагмент опухоли составляет приблизительно 9 мм^3. В некоторых вариантах осуществления фрагмент опухоли составляет приблизительно 10 мм^3. В некоторых вариантах осуществления фрагменты опухоли составляют 1-4 мм x 1-4 мм x 1-4 мм. В некоторых вариантах осуществления фрагменты опухоли составляют 1 мм x 1 мм x 1 мм. В некоторых вариантах осуществления фрагменты опухоли составляют 2 мм x 2 мм x 2 мм. В некоторых вариантах осуществления фрагменты опухоли составляют 3 мм x 3 мм x 3 мм. В некоторых вариантах осуществления фрагменты опухоли составляют 4 мм x 4 мм x 4 мм.

[00616] В некоторых вариантах осуществления опухоли фрагментируют, чтобы минимизировать количество геморрагических, некротических и/или жировых тканей на каждом кусочке. В некоторых вариантах осуществления опухоли фрагментируют, чтобы минимизировать количество геморрагической ткани на каждом кусочке. В некоторых вариантах осуществления опухоли фрагментируют, чтобы минимизировать количество некротической ткани на каждом кусочке. В некоторых вариантах осуществления опухоли фрагментируют, чтобы минимизировать количество жировой ткани на каждом кусочке. В отдельных вариантах осуществления этап фрагментации опухоли представляет собой способ, осуществляемый in vitro или ex vivo.

[00617] В некоторых вариантах осуществления фрагментацию опухоли проводят для сохранения внутренней структуры опухоли. В некоторых вариантах осуществления фрагментацию опухоли проводят без осуществления пилящего движения скальпелем. В некоторых вариантах осуществления TIL получают из гидролизатов опухолей. В некоторых вариантах осуществления гидролизаты опухолей были получены путем инкубации в ферментной среде, например, 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 ферментную среду опухоль может быть подвергнута механической диссоциации в течение примерно 1 минуты. Затем раствор может быть инкубирован в течение 30 минут при 37°C в 5% CO_2, а затем снова подвергнут механическому разрушению в течение примерно 1 минуты. После повторной инкубации в течение 30 минут при 37°C в 5% CO_2 опухоль может быть подвергнута механическому разрушению в третий раз в течение примерно 1 минуты. В некоторых вариантах осуществления после третьего механического разрушения, если присутствовали большие кусочки ткани, образец подвергали 1 или 2 дополнительным механическим диссоциациям с дополнительными 30 минутами инкубации при 37°C в 5% CO_2 или без нее. В некоторых вариантах осуществления по окончании последней инкубации, если клеточная суспензия содержит большое количество эритроцитов или мертвых клеток, для удаления этих клеток может быть проведено разделение в градиенте плотности с использованием Ficoll.

[00618] В некоторых вариантах осуществления клеточная суспензия перед этапом примирующей первой экспансии называется «первичной популяцией клеток», или «свежеполученной», или «свежевыделенной» популяцией клеток.

В некоторых вариантах осуществления клетки могут быть необязательно заморожены после выделения образца (например, после получения образца опухоли и/или после получения клеточной суспензии из образца опухоли) и храниться в замороженном виде до начала экспансии, описанной на этапе B, которая более подробно описана ниже, а также проиллюстрирована на фиг. 1 (в частности, например, фиг. 1B и/или фиг. 1C).

1. TIL, полученные посредством толстоигольной/малой биопсии

[00619] В некоторых вариантах осуществления TIL первоначально получают из образца опухоли пациента («первичные TIL»), полученного посредством толстоигольной биопсии или аналогичной процедуры, а затем подвергают экспансии до более крупной популяции для дальнейших манипуляций, как описано в настоящем документе, необязательно криоконсервируют и необязательно оценивают на фенотип и метаболические параметры.

[00620] В некоторых вариантах осуществления образец опухоли пациента может быть получен с использованием способов, известных в данной области техники, обычно с помощью малой биопсии, толстоигольной биопсии, пункционной биопсии или других средств для получения образца, содержащего смесь опухолевых и TIL-клеток. Как правило, образец опухоли может быть взят из любой солидной опухоли, включая первичные опухоли, инвазивные опухоли или метастатические опухоли. Образец опухоли также может представлять собой жидкую опухоль, такую как опухоль, образовавшаяся вследствие гематологического злокачественного новообразования. В некоторых вариантах осуществления образец может быть взят из нескольких небольших образцов опухолей или биоптатов. В некоторых вариантах осуществления образец может включать несколько образцов опухоли из одной опухоли от одного и того же пациента. В некоторых вариантах

осуществления образец может включать несколько образцов опухоли из одной, двух, трех или четырех опухолей от одного и того же пациента. В некоторых вариантах осуществления образец может включать несколько образцов опухоли из нескольких опухолей от одного и того же пациента. Солидная опухоль может относиться к любому типу рака, включая, не ограничиваясь перечисленным, рак молочной железы, поджелудочной железы, предстательной железы, колоректальный рак, рак легкого, головного мозга, почки, желудка и кожи (включая, не ограничиваясь перечисленным, плоскоклеточную карциному, базальноклеточную карциному и меланому). В некоторых вариантах осуществления рак выбран из рака шейки матки, рака головы и шеи (включая, например, плоскоклеточную карциному головы и шеи (ПКГШ)), глиобластомы (GBM), рака желудочно-кишечного тракта, рака яичника, саркомы, рака поджелудочной железы, рака мочевого пузыря, рака молочной железы, трижды негативного рака молочной железы и немелкоклеточного рака легкого (НМРЛ). В некоторых вариантах осуществления подходящие TIL получают из меланомных злокачественных опухолей, поскольку сообщалось, что они имеют особенно высокие уровни TIL.

[00621] В общем клеточная суспензия, полученная из биоптата или фрагмента опухоли, называется «первичной популяцией клеток», или «свежеполученной», или «свежевыделенной» популяцией клеток. В отдельных вариантах осуществления свежеполученную популяцию TIL подвергают воздействию среды для культивирования клеток, содержащей антигенпрезентирующие клетки, IL-2 и OKT-3.

[00622] В некоторых вариантах осуществления, если опухоль является метастатической и первичный очаг поражения эффективно лечили/удаляли в прошлом, может потребоваться удаление одного из метастатических очагов поражения. В некоторых вариантах осуществления наименее инвазивный подход заключается в удалении поражения кожи или лимфатического узла на шее или подмышечной области, если это возможно. В некоторых вариантах осуществления удаляют очаг поражения кожи или удаляют небольшой биоптат из него. В некоторых вариантах осуществления удаляют лимфатический узел или берут малую биопсию из него. В некоторых вариантах осуществления может быть использован метастатический очаг поражения легкого или печени, или внутрибрюшинный или грудной лимфатический узел, или взятая из них малая биопсия.

[00623] В некоторых вариантах осуществления опухоль представляет собой меланому. В некоторых вариантах осуществления малая биопсия меланомы включает родинку или ее часть.

[00624] В некоторых вариантах осуществления малая биопсия представляет собой щипковую биопсию. В некоторых вариантах осуществления щипковая биопсия проводится при вдавливании круглого лезвия в кожу. В некоторых вариантах осуществления щипковая биопсия проводится при вдавливании круглого лезвия в кожу вокруг вызывающей подозрения родинки. В некоторых вариантах осуществления щипковая биопсия проводится при вдавливании круглого лезвия в кожу и удалении круглого кусочка кожи. В некоторых

вариантах осуществления малая биопсия представляет собой щипковую биопсию, при которой удаляют часть опухоли в форме круга.

[00625] В некоторых вариантах осуществления малая биопсия представляет собой эксцизионную биопсию. В некоторых вариантах осуществления малая биопсия представляет собой эксцизионную биопсию, и удаляется вся родинка или опухолевое образование. В некоторых вариантах осуществления малая биопсия представляет собой эксцизионную биопсию, и удаляется вся родинка или опухолевое образование вместе с небольшой каемкой нормальной на вид кожи.

[00626] В некоторых вариантах осуществления малая биопсия представляет собой инцизионную биопсию. В некоторых вариантах осуществления малая биопсия представляет собой инцизионную биопсию, и берется только самая атипичная часть родинки или опухолевого образования. В некоторых вариантах осуществления малая биопсия представляет собой инцизионную биопсию, и инцизионную биопсию используют, когда другие методики не могут быть реализованы, например, если вызывающая подозрения родинка является слишком большой.

[00627] В некоторых вариантах осуществления малая биопсия представляет собой биопсию легкого. В некоторых вариантах осуществления малую биопсию берут с помощью бронхоскопии. Обычно при бронхоскопии пациента помещают под анестезию и пропускают небольшой инструмент через нос или рот, вниз по горлу и в бронхиальные проходы, где небольшие инструменты используются для удаления части ткани. В некоторых вариантах осуществления, когда опухоль или опухолевое образование не могут быть достигнуты с помощью бронхоскопии, может использоваться трансторакальная пункционная биопсия. Обычно при трансторакальной пункционной биопсии пациент также находится под анестезией, и иглу вводят через кожу непосредственно в вызывающее подозрения место, чтобы удалить небольшой образец ткани. В некоторых вариантах осуществления трансторакальная пункционная биопсия может потребовать интервенционной радиологии (например, использования рентгеновских лучей или компьютерной томографии для направления иглы). В некоторых вариантах осуществления малую биопсию берут с помощью пункционной биопсии. В некоторых вариантах осуществления малую биопсию берут с помощью эндоскопического ультразвукового исследования (например, эндоскоп с подсветкой вводится через рот в пищевод). В некоторых вариантах осуществления малую биопсию берут хирургическим путем.

[00628] В некоторых вариантах осуществления малая биопсия представляет собой биопсию головы и шеи. В некоторых вариантах осуществления малая биопсия представляет собой инцизионную биопсию. В некоторых вариантах осуществления малая биопсия представляет собой инцизионную биопсию, при которой из нетипично выглядящей области вырезают небольшой кусочек ткани. В некоторых вариантах осуществления, если к нетипичной области легко получить доступ, образец может быть взят без госпитализации. В некоторых вариантах осуществления, если опухоль находится глубже во рту или горле, биопсию может потребоваться провести в операционной под общей анестезией. В

некоторых вариантах осуществления малая биопсия представляет собой эксцизионную биопсию. В некоторых вариантах осуществления малая биопсия представляет собой эксцизионную биопсию, при которой удаляется вся область. В некоторых вариантах осуществления малая биопсия представляет собой тонкоигольную аспирационную биопсию (FNA). В некоторых вариантах осуществления малая биопсия представляет собой тонкоигольную аспирационную биопсию (FNA), при которой используется очень тонкая игла, присоединенная к шприцу, для извлечения (аспирации) клеток из опухоли или уплотнения. В некоторых вариантах осуществления малая биопсия представляет собой щипковую биопсию. В некоторых вариантах осуществления малая биопсия представляет собой щипковую биопсию, при которой используются биопсийные щипцы для удаления кусочка ткани из вызывающей подозрения области.

[00629] В некоторых вариантах осуществления малая биопсия представляет собой биопсию шейки матки. В некоторых вариантах осуществления малую биопсию берут посредством кольпоскопии. Обычно в методах кольпоскопии используется увеличительный инструмент с подсветкой, прикрепленный к увеличительному бинокуляру (кольпоскоп), который затем используется для взятия биопсии небольшого участка поверхности шейки матки. В некоторых вариантах осуществления малая биопсия представляет собой конизацию/конусовидную биопсию. В некоторых вариантах осуществления малая биопсия представляет собой конизацию/конусовидную биопсию, при которой может потребоваться амбулаторная хирургическая операция для удаления более крупного кусочка ткани из шейки матки. В некоторых вариантах осуществления конусовидная биопсия может служить не только для подтверждения диагноза, но и в качестве начального лечения.

[00630] Термин «солидная опухоль» относится к нетипичной массе ткани, которая обычно не содержит кист или жидких участков. Солидные опухоли могут быть доброкачественными или злокачественными. Термин «солидная раковая опухоль» относится к злокачественным, неопластическим или раковидным солидным опухолям. Солидные раковые опухоли включает, не ограничиваясь перечисленным, саркомы, карциномы и лимфомы, такие как рак легкого, молочной железы, трижды негативный рак молочной железы, предстательной железы, ободочной кишки, прямой кишки и мочевого пузыря. В некоторых вариантах осуществления рак выбран из рака шейки матки, рака головы и шеи, глиобластомы, рака яичника, саркомы, рака поджелудочной железы, рака мочевого пузыря, рака молочной железы, трижды негативного рака молочной железы и немелкоклеточного рака легкого. Тканевая структура солидных опухолей включает взаимозависимые тканевые компартменты, включая паренхиму (раковые клетки) и поддерживающие стромальные клетки, в которых рассредоточены раковые клетки и которые могут обеспечивать поддерживающее микроокружение.

[00631] В некоторых вариантах осуществления образец из опухоли получают в виде тонкоигольного аспирата (FNA), толстоигольной биопсии, малой биопсии (включая, например, щипковую биопсию). В некоторых вариантах осуществления образец сначала

помещают в G-Rex 10. В некоторых вариантах осуществления образец сначала помещают в G-Rex 10, когда имеется 1 или 2 образца толстоигольной биопсии и/или малой биопсии. В некоторых вариантах осуществления образец сначала помещают в G-Rex 100, когда имеется 3, 4, 5, 6, 8, 9 или 10, или более образцов толстоигольной биопсии и/или малой биопсии. В некоторых вариантах осуществления образец сначала помещают в G-Rex 500, когда имеется 3, 4, 5, 6, 8, 9 или 10, или более образцов толстоигольной биопсии и/или малой биопсии.

[00632] FNA может быть получена из опухоли, выбранной из группы, состоящей из опухоли легкого, меланомы, головы и шеи, шейки матки, яичника, поджелудочной железы, глиобластомы, колоректальной опухоли и саркомы. В некоторых вариантах осуществления FNA получают из опухоли легкого, такой как опухоль легкого от пациента с немелкоклеточным раком легкого (НМРЛ). В некоторых случаях пациенты с НМРЛ ранее подвергались хирургическому лечению.

[00633] TIL, описанные в настоящем документе, могут быть получены из образца FNA. В некоторых случаях образец FNA получают или выделяют от пациента с помощью иглы тонкого калибра в диапазоне от иглы 18 калибра до иглы 25 калибра. Игла тонкого калибра может быть 18 калибра, 19 калибра, 20 калибра, 21 калибра, 22 калибра, 23 калибра, 24 калибра или 25 калибра. В некоторых вариантах осуществления 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.

[00634] В некоторых случаях TIL, описанные в настоящем документе, получены из образца толстоигольной биопсии. В некоторых случаях образец толстоигольной биопсии получают или выделяют от пациента с помощью хирургической или медицинской иглы в диапазоне от иглы 11 калибра до иглы 16 калибра. Игла может быть 11 калибра, 12 калибра, 13 калибра, 14 калибра, 15 калибра или 16 калибра. В некоторых вариантах осуществления образец толстоигольной биопсии 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.

[00635] В общем собранная клеточная суспензия называется «первичной популяцией клеток» или «свежесобранной» популяцией клеток.

[00636] В некоторых вариантах осуществления TIL не получают из гидролизатов опухолей. В некоторых вариантах осуществления биоптаты солидных опухолей не фрагментируют.

[00637] В некоторых вариантах осуществления TIL получают из гидролизатов опухолей. В некоторых вариантах осуществления гидролизаты опухолей были получены путем инкубации в ферментной среде, например, 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 ферментную среду опухоль может быть

подвергнута механической диссоциации в течение примерно 1 минуты. Затем раствор может быть инкубирован в течение 30 минут при 37°C в 5% CO_2, а затем снова подвергнут механическому разрушению в течение примерно 1 минуты. После повторной инкубации в течение 30 минут при 37°C в 5% CO_2 опухоль может быть подвергнута механическому разрушению в третий раз в течение примерно 1 минуты. В некоторых вариантах осуществления после третьего механического разрушения, если присутствовали большие кусочки ткани, образец подвергали 1 или 2 дополнительным механическим диссоциациям с дополнительными 30 минутами инкубации при 37°C в 5% CO_2 или без нее. В некоторых вариантах осуществления по окончании последней инкубации, если клеточная суспензия содержит большое количество эритроцитов или мертвых клеток, для удаления этих клеток может быть проведено разделение в градиенте плотности с использованием Ficoll.

[00638]

2. Способы экспансии лимфоцитов периферической крови (PBL) из периферической крови

[00639] Способ PBL 1. В одном из вариантов осуществления изобретения PBL подвергают экспансии с использованием процессов, описанных в настоящем документе. В одном из вариантов осуществления изобретения способ включает получение образца МНПК из цельной крови. В одном из вариантов осуществления способ включает обогащение Т-клеток путем выделения чистых Т-клеток из МНПК с использованием отрицательного отбора фракции, не являющейся CD19+. В одном из вариантов осуществления способ включает обогащение Т-клеток путем выделения чистых Т-клеток из МНПК с использованием основанного на магнитных гранулах отрицательного отбора фракции, не являющейся CD19+.

[00640] В одном из вариантов осуществления изобретения способ PBL 1 осуществляют следующим образом: в день 0 криоконсервированный образец МНПК размораживают и подсчитывают количество МНПК. Т-клетки выделяют с использованием набора для выделения пан-Т-клеток человека (Human Pan T-Cell Isolation Kit) и колонок LS (Miltenyi Biotec).

[00641] Способ PBL 2. В одном из вариантов осуществления изобретения PBL подвергают экспансии с помощью способа PBL 2, который включает получение образца МНПК из цельной крови. Т-клетки из МНПК обогащают путем инкубации МНПК в течение по меньшей мере трех часов при 37°C и затем выделения неприлипающих клеток.

[00642] В одном из вариантов осуществления изобретения способ PBL 2 осуществляют следующим образом: в день 0 криоконсервированный образец МНПК размораживают, и клетки МНПК высевают из расчета 6 миллионов клеток на лунку в 6-луночный планшет в среде CM-2, и инкубируют 3 часа при 37 градусах Цельсия. Через 3 часа неприлипающие клетки, которые представляют собой PBL, удаляют и подсчитывают.

[00643] Способ PBL 3. В одном из вариантов осуществления изобретения PBL подвергают экспансии с помощью способа PBL 3, который включает получение образца МНПК из периферической крови. В-клетки выделяют с использованием отбора по CD19+,

а Т-клетки отбирают с использованием отрицательного отбора фракции, не являющейся CD19+, образца МНПК.

[00644] В одном из вариантов осуществления изобретения способ PBL 3 осуществляют следующим образом: в день 0 криоконсервированные МНПК, полученные из периферической крови, размораживают и подсчитывают. CD19+ В-клетки сортируют с использованием набора CD19 Multisort Kit, Human (Miltenyi Biotec). Из фракции клеток, не являющихся CD19+, Т-клетки очищают с использованием набора для выделения пан-Т-клеток человека и колонок LS (Miltenyi Biotec).

[00645] В одном из вариантов осуществления МНПК выделяют из образца цельной крови. В одном из вариантов осуществления образец МНПК используют в качестве исходного материала для экспансии PBL. В одном из вариантов осуществления образец подвергают криоконсервации перед процессом экспансии. В еще одном варианте осуществления в качестве исходного материала для экспансии PBL используют свежий образец. В одном из вариантов осуществления изобретения Т-клетки выделяют из МНПК с использованием способов, известных в данной области техники. В одном из вариантов осуществления Т-клетки выделяют с использованием набора для выделения пан-Т-клеток человека и колонок LS. В одном из вариантов осуществления изобретения Т-клетки выделяют из МНПК с использованием способов отбора антителами, известных в данной области техники, например, отрицательного отбора по CD19.

[00646] В одном из вариантов осуществления изобретения образец МНПК инкубируют в течение определенного периода времени при желаемой температуре, эффективной для идентификации неприлипающих клеток. В одном из вариантов осуществления изобретения время инкубации составляет приблизительно 3 часа. В одном из вариантов осуществления изобретения температура составляет приблизительно 37° Цельсия. Затем неприлипающие клетки подвергают экспансии с использованием процесса, описанного выше.

[00647] В некоторых вариантах осуществления образец МНПК получен от субъекта или пациента, который необязательно получал предварительное лечение режимом, включающим ингибитор киназы или ингибитор ITK. В некоторых вариантах осуществления образец опухоли получен от субъекта или пациента, который получал предварительное лечение режимом, включающим ингибитор киназы или ингибитор ITK. В некоторых вариантах осуществления образец МНПК получен от субъекта или пациента, который получал предварительное лечение режимом, включающим ингибитор киназы или ингибитор ITK, 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 1 года, или более. В еще одном варианте осуществления МНПК получены от пациента, который в настоящее время получает лечение режимом ингибитора ITK, такого как ибрутиниб.

[00648] В некоторых вариантах осуществления образец МНПК получен от субъекта или пациента, который получал предварительное лечение режимом, включающим

ингибитор киназы или ингибитор ITK, и является рефрактерным к лечению ингибитором киназы или ингибитором ITK, таким как ибрутиниб.

[00649] В некоторых вариантах осуществления образец МНПК получен от субъекта или пациента, который получал предварительное лечение режимом, включающим ингибитор киназы или ингибитор ITK, но больше не проходит лечение ингибитором киназы или ингибитором ITK. В некоторых вариантах осуществления образец МНПК получен от субъекта или пациента, который получал предварительное лечение режимом, включающим ингибитор киназы или ингибитор ITK, но больше 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 более. В еще одном варианте осуществления МНПК получены от пациента, который ранее подвергался воздействию ингибитора ITK, но не получал лечения в течение по меньшей мере 3 месяцев, по меньшей мере 6 месяцев, по меньшей мере 9 месяцев или по меньшей мере 1 года.

[00650] В одном из вариантов осуществления изобретения в день 0 клетки отбирают по CD19+ и соответствующим образом сортируют. В одном из вариантов осуществления изобретения отбор производят с использованием гранул со связывающими антителами. В одном из вариантов осуществления изобретения чистые Т-клетки выделяют в день 0 из МНПК.

[00651] В одном из вариантов осуществления изобретения для пациентов, которые не получали предварительного лечения ибрутинибом или другим ингибитором ITK, 10-15 мл лейкотромбоцитарного слоя даст приблизительно 5×10^9 МНПК, что, в свою очередь, даст приблизительно $5,5\times10^7$ PBL.

[00652] В одном из вариантов осуществления изобретения для пациентов, которые получали предварительное лечение ибрутинибом или другим ингибитором ITK, процесс экспансии даст приблизительно 20×10^9 PBL. В одном из вариантов осуществления изобретения $40,3\times10^6$ МНПК даст приблизительно $4,7\times10^5$ PBL.

[00653] В любом из вышеупомянутых вариантов осуществления МНПК могут быть получены из образца цельной крови, аферезом, из лейкотромбоцитарного слоя или любым другим способом, известным в данной области техники для получения МНПК.

3. Способы экспансии лимфоцитов, инфильтрирующих костный мозг (MIL), из МНПК, полученных из костного мозга

[00654] Способ MIL 3. В одном из вариантов осуществления изобретения способ включает получение МНПК из костного мозга. В день 0 МНПК отбирают по CD3+/CD33+/CD20+/CD14+ и сортируют, фракцию клеток, не являющуюся CD3+/CD33+/CD20+/CD14+, обрабатывают ультразвуком, и часть обработанной ультразвуком фракции клеток добавляют обратно к отобранной фракции клеток.

[00655] В одном из вариантов осуществления изобретения способ MIL 3 осуществляют следующим образом: в день 0 криоконсервированный образец МНПК

размораживают и подсчитывают количество МНПК. Клетки окрашивают антителами к CD3, CD33, CD20 и CD14 и сортируют с помощью сортировщика клеток S3e (Bio-Rad). Клетки разделяют на две фракции - фракцию иммунных клеток (или фракцию MIL) (CD3+CD33+CD20+CD14+) и фракцию бластных клеток ОМЛ (не являющихся CD3+CD33+CD20+CD14+).

[00656] В одном из вариантов осуществления изобретения МНПК получают из костного мозга. В одном из вариантов осуществления МНПК получают из костного мозга посредством афереза, аспирации, пункционной биопсии или других подобных средств, известных в данной области техники. В одном из вариантов осуществления МНПК являются свежими. В еще одном варианте осуществления МНПК являются криоконсервированными.

[00657] В одном из вариантов осуществления изобретения MIL подвергают экспансии из 10-50 мл аспирата костного мозга. В одном из вариантов осуществления изобретения от пациента получают 10 мл аспирата костного мозга. В еще одном варианте осуществления от пациента получают 20 мл аспирата костного мозга. В еще одном варианте осуществления от пациента получают 30 мл аспирата костного мозга. В еще одном варианте осуществления от пациента получают 40 мл аспирата костного мозга. В еще одном варианте осуществления от пациента получают 50 мл аспирата костного мозга.

[00658] В одном из вариантов осуществления изобретения количество МНПК, полученное из приблизительно 10-50 мл аспирата костного мозга, составляет от приблизительно 5×10^7 до приблизительно 10×10^7 МНПК. В еще одном варианте осуществления количество полученных МНПК составляет приблизительно 7×10^7 МНПК.

[00659] В одном из вариантов осуществления изобретения от приблизительно 5×10^7 до приблизительно 10×10^7 МНПК дает от приблизительно $0{,}5\times10^6$ до приблизительно $1{,}5\times10^6$ MIL. В одном из вариантов осуществления изобретения получают приблизительно 1×10^6 MIL.

[00660] В одном из вариантов осуществления изобретения 12×10^6 МНПК, полученных из аспирата костного мозга, дает приблизительно $1{,}4\times10^5$ MIL.

[00661] В любом из вышеупомянутых вариантов осуществления МНПК могут быть получены из образца цельной крови, из костного мозга, аферезом, из лейкотромбоцитарного слоя или любым другим способом, известным в данной области техники для получения МНПК.

4. Предварительный отбор по PD-1 (как проиллюстрировано на этапе A2 фиг. 1)

[00662] В соответствии со способами согласно настоящему изобретению TIL предварительно отбирают как положительные по PD-1 (PD-1+) до примирующей первой экспансии.

[00663] В некоторых вариантах осуществления требуется по меньшей мере 3000 TIL для высевания в первой экспансии. В некоторых вариантах осуществления этап предварительного отбора дает по меньшей мере 3000 TIL. В некоторых вариантах осуществления требуется по меньшей мере 4000 TIL для высевания в первой экспансии. В

некоторых вариантах осуществления этап предварительного отбора дает по меньшей мере 4000 TIL. В некоторых вариантах осуществления требуется по меньшей мере 5000 TIL для высевания в первой экспансии. В некоторых вариантах осуществления этап предварительного отбора дает по меньшей мере 5000 TIL. В некоторых вариантах осуществления требуется по меньшей мере 6000 TIL для высевания в первой экспансии. В некоторых вариантах осуществления этап предварительного отбора дает по меньшей мере 6000 TIL. В некоторых вариантах осуществления требуется по меньшей мере 7000 TIL для высевания в первой экспансии. В некоторых вариантах осуществления этап предварительного отбора дает по меньшей мере 7000 TIL. В некоторых вариантах осуществления требуется по меньшей мере 8000 TIL для высевания в первой экспансии. В некоторых вариантах осуществления этап предварительного отбора дает по меньшей мере 8000 TIL. В некоторых вариантах осуществления требуется по меньшей мере 9000 TIL для высевания в первой экспансии. В некоторых вариантах осуществления этап предварительного отбора дает по меньшей мере 9000 TIL. В некоторых вариантах осуществления требуется по меньшей мере 10000 TIL для высевания в первой экспансии. В некоторых вариантах осуществления этап предварительного отбора дает по меньшей мере 10000 TIL. В некоторых вариантах осуществления клетки выращивают или подвергают экспансии до плотности 200000. В некоторых вариантах осуществления клетки выращивают или подвергают экспансии до плотности 200000, чтобы обеспечить приблизительно 2e8 TIL для инициации быстрой второй экспансии. В некоторых вариантах осуществления клетки выращивают или подвергают экспансии до плотности 150000. В некоторых вариантах осуществления клетки выращивают или подвергают экспансии до плотности 150000, чтобы обеспечить приблизительно 2e8 TIL для инициации быстрой второй экспансии. В некоторых вариантах осуществления клетки выращивают или подвергают экспансии до плотности 250000. В некоторых вариантах осуществления клетки выращивают или подвергают экспансии до плотности 250000, чтобы обеспечить приблизительно 2e8 TIL для инициации быстрой второй экспансии. В некоторых вариантах осуществления минимальная плотность клеток составляет 10000 клеток для получения 10e6 для инициации быстрой второй экспансии. В некоторых вариантах осуществления плотность высевания 10e6 для инициации быстрой второй экспансии может обеспечить выход более 1e9 TIL.

[00664] В некоторых вариантах осуществления TIL для применения в примирующей первой экспансии являются положительными по PD-1 (PD-1+) (например, после предварительного отбора и перед примирующей первой экспансией). В некоторых вариантах осуществления TIL для применения в примирующей первой экспансии являются по меньшей мере на 75% положительными по PD-1, по меньшей мере на 80% положительными по PD-1, по меньшей мере на 85% положительными по PD-1, по меньшей мере на 90% положительными по PD-1, по меньшей мере на 95% положительными по PD-1, по меньшей мере на 98% положительными по PD-1 или по меньшей мере на 99% положительными по PD-1 (например, после предварительного отбора и перед

примирующей первой экспансией). В некоторых вариантах осуществления популяция PD-1 представляет собой PD-1high. В некоторых вариантах осуществления TIL для применения в примирующей первой экспансии являются по меньшей мере на 25% PD-1high, по меньшей мере на 30% PD-1high, по меньшей мере на 35% PD-1high, по меньшей мере на 40% PD-1high, по меньшей мере на 45% PD-1high, по меньшей мере на 50% PD-1high, по меньшей мере на 55% PD-1high, по меньшей мере на 60% PD-1high, по меньшей мере на 65% PD-1high, по меньшей мере на 70% PD-1high, по меньшей мере на 75% PD-1high, по меньшей мере на 80% PD-1high, по меньшей мере на 85% PD-1high, по меньшей мере на 90% PD-1high, по меньшей мере на 95% PD-1high, по меньшей мере на 98% PD-1high или по меньшей мере на 99% PD-1high (например, после предварительного отбора и перед примирующей первой экспансией).

[00665] В некоторых вариантах осуществления предварительный отбор положительных по PD-1 TIL проводят путем окрашивания TIL из первичной популяции клеток, гидролизатов цельных опухолей и/или суспензий клеток цельных опухолей с помощью антитела к PD-1. В некоторых вариантах осуществления антитело к PD-1 представляет собой поликлональное антитело, например, мышиное поликлональное антитело к PD-1 человека, козье поликлональное антитело к PD-1 человека и т. д. В некоторых вариантах осуществления антитело к PD-1 представляет собой моноклональное антитело. В некоторых вариантах осуществления антитело к PD-1 включает, например, не ограничиваясь перечисленным, EH12.2H7, PD1.3.1, M1H4, ниволумаб (BMS-936558, Bristol-Myers Squibb; Opdivo®), пембролизумаб (ламбролизумаб, MK03475 или MK-3475, Merck; Keytruda®), H12.1, PD1.3.1, NAT 105, гуманизированное антитело к PD-1 JS001 (ShangHai JunShi), моноклональное антитело к PD-1 TSR-042 (Tesaro, Inc.), пидилизумаб (mAb к PD-1 CT-011, Medivation), моноклональное антитело к PD-1 BGB-A317 (BeiGene) и/или антитело к PD-1 SHR-1210 (ShangHai HengRui), моноклональное антитело REGN2810 человека (Regeneron), моноклональное антитело MDX-1106 человека (Bristol-Myers Squibb) и/или гуманизированное антитело IgG4 к PD-1 PDR001 (Novartis). В некоторых вариантах осуществления антитело к PD-1 происходит из клона: RMP1-14 (крысиный IgG) - BioXcell, № по каталогу BP0146. Другие подходящие антитела для применения в предварительном отборе положительных по PD-1 TIL для применения в экспансии TIL в соответствии со способами согласно изобретению, как показано на этапах с A по F, как описано в настоящем документе, представляют собой антитела к PD-1, раскрытые в патенте США № 8008449, включенном в настоящий документ посредством ссылки. В некоторых вариантах осуществления антитело к PD-1 для применения в предварительном отборе связывается с эпитопом, отличным от эпитопа, с которым связывается ниволумаб (BMS-936558, Bristol-Myers Squibb; Opdivo®). В некоторых вариантах осуществления антитело к PD-1 для применения в предварительном отборе связывается с эпитопом, отличным от эпитопа, с которым связывается пембролизумаб (ламбролизумаб, MK03475 или MK-3475, Merck; Keytruda®). В некоторых вариантах осуществления антитело к PD-1 для применения в предварительном отборе связывается с эпитопом, отличным от эпитопа, с которым

связывается гуманизированное антитело к PD-1 JS001 (ShangHai JunShi). В некоторых вариантах осуществления антитело к PD-1 для применения в предварительном отборе связывается с эпитопом, отличным от эпитопа, с которым связывается моноклональное антитело к PD-1 TSR-042 (Tesaro, Inc.). В некоторых вариантах осуществления антитело к PD-1 для применения в предварительном отборе связывается с эпитопом, отличным от эпитопа, с которым связывается пидилизумаб (mAb к D-1 CT-011, Medivation). В некоторых вариантах осуществления антитело к PD-1 для применения в предварительном отборе связывается с эпитопом, отличным от эпитопа, с которым связывается моноклональное антитело к PD-1 BGB-A317 (BeiGene). В некоторых вариантах осуществления антитело к PD-1 для применения в предварительном отборе связывается с эпитопом, отличным от эпитопа, с которым связывается антитело к PD-1 SHR-1210 (ShangHai HengRui). В некоторых вариантах осуществления антитело к PD-1 для применения в предварительном отборе связывается с эпитопом, отличным от эпитопа, с которым связывается моноклональное антитело REGN2810 человека (Regeneron). В некоторых вариантах осуществления антитело к PD-1 для применения в предварительном отборе связывается с эпитопом, отличным от эпитопа, с которым связывается моноклональное антитело MDX-1106 человека (Bristol-Myers Squibb). В некоторых вариантах осуществления антитело к PD-1 для применения в предварительном отборе связывается с эпитопом, отличным от эпитопа, с которым связывается гуманизированное антитело IgG4 к PD-1 PDR001 (Novartis). В некоторых вариантах осуществления антитело к PD-1 для применения в предварительном отборе связывается с эпитопом, отличным от эпитопа, с которым связывается RMP1-14 (крысиный IgG) - BioXcell, № по каталогу BP0146. Структуры для связывания ниволумаба и связывания пембролизумаба с PD-1 известны и описаны, например, в Tan, S. et al. (Tan, S. et al., *Nature Communications*, 8:14369 | DOI: 10.1038/ncomms14369 (2017); включено в настоящий документ посредством ссылки в полном объеме для всех целей). В некоторых вариантах осуществления антитело к PD-1 представляет собой EH12.2H7. В некоторых вариантах осуществления антитело к PD-1 представляет собой PD1.3.1. В некоторых вариантах осуществления антитело к PD-1 не представляет собой PD1.3.1. В некоторых вариантах осуществления антитело к PD-1 представляет собой M1H4. В некоторых вариантах осуществления антитело к PD-1 не представляет собой M1H4.

[00666] В некоторых вариантах осуществления антитело к PD-1 для применения в предварительном отборе связывает по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или по меньшей мере 100% клеток, экспрессирующих PD-1.

[00667] В некоторых вариантах осуществления пациент получал лечение антителом к PD-1. В некоторых вариантах осуществления субъект не подвергался лечению антителом к PD-1. В некоторых вариантах осуществления субъект не получал лечение антителом к PD-1. В некоторых вариантах осуществления субъект ранее получал лечение химиотерапевтическим агентом. В некоторых вариантах осуществления субъект ранее

получал лечение химиотерапевтическим агентом, но больше не получает лечение химиотерапевтическим агентом. В некоторых вариантах осуществления субъект прошел химиотерапевтическое лечение или лечение антителом к PD-1. В некоторых вариантах осуществления субъект прошел химиотерапевтическое лечение и лечение антителом к PD-1. В некоторых вариантах осуществления пациент не подвергался лечению антителом к PD-1. В некоторых вариантах осуществления субъект имеет рак, не подвергавшийся лечению, или прошел химиотерапевтическое лечение, но не подвергался лечению антителом к PD-1. В некоторых вариантах осуществления субъект не подвергался лечению и прошел химиотерапевтическое лечение, но не подвергался лечению антителом к PD-1.

[00668] В некоторых вариантах осуществления, где пациент ранее получал лечение первым антителом к PD-1, предварительный отбор проводят путем окрашивания первичной популяции клеток, гидролизатов цельных опухолей и/или суспензий клеток цельных опухолей вторым антителом к PD-1, связывание которого с PD-1 на поверхности TIL первичной популяции клеток не блокируется первым антителом к PD-1.

[00669] В некоторых вариантах осуществления, где пациент ранее получал лечение антителом к PD-1, предварительный отбор проводят путем окрашивания TIL первичной популяции клеток антителом («антителом к Fc»), которое связывается с Fc-областью антитела к PD-1, переведенного в нерастворимую форму на поверхности TIL первичной популяции клеток. В некоторых вариантах осуществления антитело к Fc представляет собой поликлональное антитело, например, мышиное поликлональное антитело к Fc человека, козье поликлональное антитело к Fc человека и т. д. В некоторых вариантах осуществления антитело к Fc представляет собой моноклональное антитело. В некоторых вариантах осуществления, где пациент ранее получал лечение человеческим или гуманизированным антителом IgG к PD-1, TIL первичной популяции клеток окрашивают антителом к IgG человека. В некоторых вариантах осуществления, где пациент ранее получал лечение человеческим или гуманизированным антителом IgG1 к PD-1, TIL первичной популяции клеток окрашивают антителом к IgG1 человека. В некоторых вариантах осуществления, где пациент ранее получал лечение человеческим или гуманизированным антителом IgG2 к PD-1, TIL первичной популяции клеток окрашивают антителом к IgG2 человека. В некоторых вариантах осуществления, где пациент ранее получал лечение человеческим или гуманизированным антителом IgG3 к PD-1, TIL первичной популяции клеток окрашивают антителом к IgG3 человека. В некоторых вариантах осуществления, где пациент ранее получал лечение человеческим или гуманизированным антителом IgG4 к PD-1, TIL первичной популяции клеток окрашивают антителом к IgG4 человека.

[00670] В некоторых вариантах осуществления, где пациент ранее получал лечение антителом к PD-1, предварительный отбор проводят путем приведения TIL первичной популяции клеток в контакт с тем же антителом к PD-1, и затем окрашивания TIL первичной популяции клеток антителом к Fc, которое связывается с Fc-областью антитела к PD-1, переведенного в нерастворимую форму на поверхности TIL первичной популяции

клеток.

[00671] В некоторых вариантах осуществления предварительный отбор проводят с использованием метода сортировки клеток. В некоторых вариантах осуществления метод сортировки клеток представляет собой метод проточной цитометрии, например, сортировку клеток с активированной флуоресценцией (FACS). В некоторых вариантах осуществления интенсивность флуорофора как в первой популяции, так и в популяции МНПК используют для настройки гейтов FACS для установления низкого, среднего и высокого уровней интенсивности, которые соответствуют отрицательным по PD-1 TIL, промежуточным по PD-1 TIL и положительным по PD-1 TIL, соответственно. В некоторых вариантах осуществления метод сортировки клеток осуществляют таким образом, что гейты устанавливаются на высокий, средний (также называемый промежуточным) и низкий (также называемый отрицательным) уровень с использованием МНПК, контроля FMO и самого образца, чтобы различить эти три популяции. В некоторых вариантах осуществления МНПК используют в качестве контроля гейтирования. В некоторых вариантах осуществления популяция PD-1high определена как популяция клеток, положительных по PD-1 в более высокой степени, чем наблюдаемая в МНПК. В некоторых вариантах осуществления промежуточная по PD-1+ популяция в TIL включает PD-1+ клетки в МНПК. В некоторых вариантах осуществления отрицательные популяции гейтируют на основе FMO. В некоторых вариантах осуществления гейты FACS настраивают после этапа получения и/или приема первой популяции TIL из опухоли, резецированной у субъекта, путем обработки образца опухоли, полученного от указанного субъекта, с получением множества фрагментов опухоли. В некоторых вариантах осуществления гейтирование настраивают для каждого сорта. В некоторых вариантах осуществления гейтирование настраивают для каждого образца МНПК. В некоторых вариантах осуществления гейтирование настраивают для каждого образца МНПК. В некоторых вариантах осуществления шаблон гейтирования настраивают из МНПК каждые 10 дней, 20 дней, 30 дней, 40 дней, 50 дней или 60 дней. В некоторых вариантах осуществления шаблон гейтирования настраивают из МНПК каждые 60 дней. В некоторых вариантах осуществления шаблон гейтирования настраивают для каждого образца МНПК каждые 10 дней, 20 дней, 30 дней, 40 дней, 50 дней или 60 дней. В некоторых вариантах осуществления шаблон гейтирования настраивают для каждого образца МНПК каждые 60 дней.

[00672] В некоторых вариантах осуществления предварительный отбор включает отбор положительных по PD-1 TIL из первой популяции TIL с получением обогащенной по PD-1 популяции TIL включает отбор популяции TIL из первой популяции TIL, которая содержит по меньшей мере от 11,27% до 74,4% положительных по PD-1 TIL. В некоторых вариантах осуществления первая популяция TIL содержит по меньшей мере от 20% до 80% положительных по PD-1 TIL, по меньшей мере от 20% до 80% положительных по PD-1 TIL, по меньшей мере от 30% до 80% положительных по PD-1 TIL, по меньшей мере от 40% до 80% положительных по PD-1 TIL, по меньшей мере от 50% до 80% положительных по PD-1

TIL, по меньшей мере от 10% до 70% положительных по PD-1 TIL, по меньшей мере от 20% до 70% положительных по PD-1 TIL, по меньшей мере от 30% до 70% положительных по PD-1 TIL или по меньшей мере от 40% до 70% положительных по PD-1 TIL.

[00673] В некоторых вариантах осуществления этап отбора (например, предварительного отбора и/или отбора положительных по PD-1 клеток) включает следующие этапы:

(i) воздействия на первую популяцию TIL и популяцию МНПК избытка моноклонального антитела IgG4 к PD-1, которое связывается с PD-1 через N-концевую петлю за пределами домена IgV PD-1,

(ii) добавления избытка антитела к IgG4, конъюгированного с флуорофором,

(iii) получения обогащенной по PD-1 популяции TIL на основе интенсивности флуорофора положительных по PD-1 TIL в первой популяции TIL по сравнению с интенсивностью в популяции МНПК, оцениваемых с помощью сортировки клеток с активированной флуоресценцией (FACS).

[00674] В некоторых вариантах осуществления положительные по PD-1 TIL представляют собой PD-1high TIL.

[00675] В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 70% обогащенной по PD-1 популяции TIL представляют собой положительные по PD-1 TIL. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 80% обогащенной по PD-1 популяции TIL представляют собой положительные по PD-1 TIL. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 90% обогащенной по PD-1 популяции TIL представляют собой положительные по PD-1 TIL. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 95% обогащенной по PD-1 популяции TIL представляют собой положительные по PD-1 TIL. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 99% обогащенной по PD-1 популяции TIL представляют собой положительные по PD-1 TIL. В некоторых вариантах осуществления 100% обогащенной по PD-1 популяции TIL представляют собой положительные по PD-1 TIL.

[00676] Различные антитела к PD-1 проявляют разные характеристики связывания с разными эпитопами в PD-1. В некоторых вариантах осуществления антитело к PD-1 связывается с эпитопом, отличным от эпитопа, с которым связывается пембролизумаб. В некоторых вариантах осуществления антитело к PD1 связывается с эпитопом в N-концевой петле за пределами домена IgV PD-1. В некоторых вариантах осуществления антитело к PD1 связывается через N-концевую петлю за пределами домена IgV PD-1. В некоторых вариантах осуществления антитело к PD-1 представляет собой антитело к PD-1, которое связывается с PD-1 через N-концевую петлю за пределами домена IgV PD-1. В некоторых вариантах осуществления антитело к PD-1 представляет собой моноклональное антитело к PD-1, которое связывается с PD-1 через N-концевую петлю за пределами домена IgV PD-1. В некоторых вариантах осуществления моноклональное антитело к PD-1 представляет собой антитело IgG4 к PD-1, которое связывается с PD-1 через N-концевую петлю за пределами домена IgV PD-1. См., например, Tan, S. Nature Comm. Vol 8, Argicle 14369: 1-

10 (2017).

[00677] В некоторых вариантах осуществления этап отбора, проиллюстрированный как этап A2 на фиг. 1, включает этапы (i) воздействия на первую популяцию TIL избытка моноклонального антитела IgG4 к PD-1, которое связывается с PD-1 через N-концевую петлю за пределами домена IgV PD-1, (ii) добавления избытка антитела к IgG4, конъюгированного с флуорофором, и (iii) проведения проточной сортировки клеток на основе флуорофора с получением обогащенной по PD-1 популяции TIL. В некоторых вариантах осуществления моноклональное антитело IgG4 к PD-1 представляет собой ниволумаб или его варианты, фрагменты или конъюгаты. В некоторых вариантах осуществления антитело к IgG4 представляет собой клон к IgG4 человека, клон HP6023. В некоторых вариантах осуществления антитело к PD-1 для применения в отборе на этапе (b) связывается с тем же эпитопом, что и EH12.2H7 или ниволумаб.

[00678] В некоторых вариантах осуществления используют способ гейтирования по PD-1 согласно WO2019156568. Чтобы определить, являются ли TIL, полученные из образца опухоли, PD-1high, специалист в данной области техники может использовать референсное значение, соответствующее уровню экспрессии PD-1 в периферических Т-клетках, полученном из образца крови от одного или более здоровых людей. PD-1-положительные клетки в референсном образце могут быть определены с использованием контролей флуоресценция минус один (FMO) и соответствующих изотипических контролей. В некоторых вариантах осуществления уровень экспрессии PD-1 измеряют в CD3+/PD-1+ периферических Т-клетках здорового субъекта (например, референсных клетках) и используют для установления порогового значения или значения отсечки интенсивности иммуноокрашивания на PD-1 в TIL, полученных из опухоли. Пороговое значение может быть определено как минимальная интенсивность иммуноокрашивания на PD-1 PD-1high Т-клеток. Таким образом, TIL с экспрессией PD-1, равной или превышающей пороговое значение, могут рассматриваться как PD-1high клетки. В некоторых случаях PD-1high TIL представляют собой такие, у которых наивысшая интенсивность иммуноокрашивания на PD-1 соответствует максимум 1% или менее от общего количества CD3+ клеток. В других случаях PD-1high TIL представляют собой такие, у которых наивысшая интенсивность иммуноокрашивания на PD-1 соответствует максимум 0,75% или менее от общего количества CD3+ клеток. В некоторых случаях PD-1high TIL представляют собой такие, у которых наивысшая интенсивность иммуноокрашивания на PD-1 соответствует максимум 0,50% или менее от общего количества CD3+ клеток. В одном случае PD-1high TIL представляют собой такие, у которых наивысшая интенсивность иммуноокрашивания на PD-1 соответствует максимум 0,25% или менее от общего количества CD3+ клеток.

Флурофоры

[00679] В некоторых вариантах осуществления TIL первичной популяции клеток окрашивают коктейлем, который включает антитело к PD-1, связанное с флуорофором, и антитело к CD3, связанное с флуорофором. В некоторых вариантах осуществления TIL первичной популяции клеток окрашивают коктейлем, который включает антитело к PD-1,

связанное с флуорофором (например, PE, фиолетовый live/dead (краситель, выявляющий жизнеспособные клетки)), и анти-CD3-FITC. В некоторых вариантах осуществления TIL первичной популяции клеток окрашивают коктейлем, который включает анти-PD-1-PE, анти-CD3-FITC и синий краситель live/dead (ThermoFisher, Массачусетс, № по каталогу L23105). В некоторых вариантах осуществления после инкубации с антителом к PD1 положительные по PD-1 клетки отбирают для экспансии в соответствии с примирующей первой экспансией, описанной в настоящем документе, например, на этапе B.

[00680] В некоторых вариантах осуществления флуофор включает, не ограничиваясь перечисленным, PE (фикоэритрин), APC (аллофикоцианин), PerCP (перидинин-хлорофилл протеин), DyLight 405, Alexa Fluor 405, Pacific Blue, Alexa Fluor 488, FITC (флуоресцеин изотиоцианат), DyLight 550, Alexa Fluor 647, DyLight 650 и Alexa Fluor 700. В некоторых вариантах осуществления флуофор включает, не ограничиваясь перечисленным, PE-Alexa Fluor® 647, PE-Cy5, PerCP-Cy5.5, PE-Cy5.5, PE-Alexa Fluor® 750, PE-Cy7 и APC-Cy7. В некоторых вариантах осуществления флуофор включает, не ограничиваясь перечисленным, флуоресцеиновый краситель. Примеры флуоресцеиновых красителей включают, не ограничиваясь перечисленным, 5-карбоксифлуоресцеин, флуоресцеин-5-изотиоцианат и 6-карбоксифлуоресцеин, 5,6-дикарбоксифлуоресцеин, 5- (и 6)-сульфофлуоресцеин, сульфонфлуоресцеин, сукцинилфлуоресцеин, 5- (и 6)-карбокси-SNARF-1, карбоксифлуоресцеин сульфонат, цвиттерион карбоксифлуоресцеина, четвертичный аммониевый карбоксифлуоресцеин, карбоксифлуоресцеин фосфонат, карбоксифлуоресцеин ГАМК, 5'(6')-карбоксифлуоресцеин, карбоксифлуоресцеин-cys-Cy5 и флуоресцеин-глутатион. В некоторых вариантах осуществления флуоресцентный фрагмент представляет собой родаминовый краситель. Примеры родаминовых красителей включают, не ограничиваясь перечисленным, тетраметилродамин-6-изотиоцианат, 5-карбокситетраметилродамин, производные 5-карбоксиродола, карбоксиродамин 110, тетраметил- и тетраэтилродамин, дифенилдиметил- и дифенилдиэтилродамин, динафтилродамин, родамин 101 сульфонилхлорид (продается под товарным знаком TEXAS RED®). В некоторых вариантах осуществления флуоресцентный фрагмент представляет собой цианиновый краситель. Примеры цианиновых красителей включают, не ограничиваясь перечисленным, Cy3, Cy3B, Cy3.5, Cy5, Cy5.5 и Cy 7.

ЭТАП B. Примирующая первая экспансия

[00681] В некоторых вариантах осуществления настоящие способы обеспечивают более молодые TIL, которые могут обеспечивать дополнительные терапевтические преимущества по сравнению с более старыми TIL (т. е., TIL, которые дополнительно подверглись большему количеству циклов репликации перед введением субъекту/пациенту). Особенности молодых TIL описаны в литературе, например, в источниках 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 посредством ссылки в полном объеме.

[00682] После диссекции или ферментативного гидролиза (например, для получения гидролизатов цельных опухолей и/или суспензий клеток цельных опухолей) фрагментов опухоли и/или фрагментов опухоли, например, как описано на этапе A на фиг. 1 (в частности, например, фиг. 1B и/или фиг. 1C), полученные клетки культивируют в сыворотке, содержащей IL-2, OKT-3 и фидерные клетки (например, антигенпрезентирующие фидерные клетки или аллогенные облученные МНПК), в условиях, которые способствуют росту TIL по сравнению с опухолевыми и другими клетками. В некоторых вариантах осуществления IL-2, OKT-3 и фидерные клетки добавляют при начале культивирования вместе с гидролизатом опухоли и/или фрагментами опухоли (например, в день 0). В некоторых вариантах осуществления гидролизаты опухоли и/или фрагменты опухоли инкубируют в контейнере, содержащем до 60 фрагментов (в вариантах осуществления, где используют фрагменты) на контейнер, и с 6000 МЕ/мл IL-2. В некоторых вариантах осуществления эту первичную популяцию клеток культивируют в течение нескольких дней, обычно от 1 до 8 дней, с получением общей популяции TIL, обычно приблизительно 1×10^8 общей массы TIL-клеток. В некоторых вариантах осуществления эту первичную популяцию клеток культивируют в течение нескольких дней, обычно от 1 до 7 дней, с получением общей популяции TIL, обычно приблизительно 1×10^8 общей массы TIL-клеток. В некоторых вариантах осуществления примирующая первая экспансия происходит в течение от 1 до 8 дней, с получением общей популяции TIL, обычно приблизительно 1×10^8 общей массы TIL-клеток. В некоторых вариантах осуществления примирующая первая экспансия происходит в течение от 1 до 7 дней, с получением общей популяции TIL, обычно приблизительно 1×10^8 общей массы TIL-клеток. В некоторых вариантах осуществления эта примирующая первая экспансия происходит в течение от 5 до 8 дней, с получением общей популяции TIL, обычно приблизительно 1×10^8 общей массы TIL-клеток. В некоторых вариантах осуществления эта примирующая первая экспансия происходит в течение от 5 до 7 дней, с получением общей популяции TIL, обычно приблизительно 1×10^8 общей массы TIL-клеток. В некоторых вариантах осуществления эта примирующая первая экспансия происходит в течение приблизительно от 6 до 8 дней, с получением общей популяции TIL, обычно приблизительно 1×10^8 общей массы TIL-клеток. В некоторых вариантах осуществления эта примирующая первая экспансия происходит в течение приблизительно от 6 до 7 дней, с получением общей популяции TIL, обычно приблизительно 1×10^8 общей массы TIL-клеток. В некоторых вариантах осуществления эта примирующая первая экспансия происходит в течение приблизительно от 7 до 8 дней, с получением общей популяции TIL, обычно приблизительно 1×10^8 общей массы TIL-клеток. В некоторых вариантах осуществления эта примирующая первая экспансия происходит в течение приблизительно 7 дней, с получением общей популяции TIL, обычно приблизительно 1×10^8 общей массы

TIL-клеток. В некоторых вариантах осуществления эта примирующая первая экспансия происходит в течение приблизительно 8 дней, с получением общей популяции TIL, обычно приблизительно 1×10^8 общей массы TIL-клеток.

[00683] В некоторых вариантах осуществления

[00684] Может быть введена любая подходящая доза TIL. В некоторых вариантах осуществления вводят от приблизительно $2{,}3\times10^{10}$ до приблизительно $13{,}7\times10^{10}$ TIL, в среднем около $7{,}8\times10^{10}$ TIL, в частности, если рак представляет собой меланому. В одном из вариантов осуществления вводят от приблизительно $1{,}2\times10^{10}$ до приблизительно $4{,}3\times10^{10}$ TIL. В некоторых вариантах осуществления вводят от приблизительно 3×10^{10} до приблизительно 12×10^{10} TIL. В некоторых вариантах осуществления вводят от приблизительно 4×10^{10} до приблизительно 10×10^{10} TIL. В некоторых вариантах осуществления вводят от приблизительно 5×10^{10} до приблизительно 8×10^{10} TIL. В некоторых вариантах осуществления вводят от приблизительно 6×10^{10} до приблизительно 8×10^{10} TIL. В некоторых вариантах осуществления вводят от приблизительно 7×10^{10} до приблизительно 8×10^{10} TIL. В некоторых вариантах осуществления терапевтически эффективная дозировка составляет от приблизительно $2{,}3\times10^{10}$ до приблизительно $13{,}7\times10^{10}$. В некоторых вариантах осуществления терапевтически эффективная дозировка составляет приблизительно $7{,}8\times10^{10}$, в особенности когда рак представляет собой меланому. В некоторых вариантах осуществления терапевтически эффективная дозировка составляет от приблизительно $1{,}2\times10^{10}$ до приблизительно $4{,}3\times10^{10}$ TIL. В некоторых вариантах осуществления терапевтически эффективная дозировка составляет от приблизительно 3×10^{10} до приблизительно 12×10^{10} TIL. В некоторых вариантах осуществления терапевтически эффективная дозировка составляет от приблизительно 4×10^{10} до приблизительно 10×10^{10} TIL. В некоторых вариантах осуществления терапевтически эффективная дозировка составляет от приблизительно 5×10^{10} до приблизительно 8×10^{10} TIL. В некоторых вариантах осуществления терапевтически эффективная дозировка составляет от приблизительно 6×10^{10} до приблизительно 8×10^{10} TIL. В некоторых вариантах осуществления терапевтически эффективная дозировка составляет от приблизительно 7×10^{10} до приблизительно 8×10^{10} TIL.

[00685] В некоторых вариантах осуществления количество TIL, содержащееся в фармацевтических композициях согласно изобретению, составляет приблизительно 1×10^6, 2×10^6, 3×10^6, 4×10^6, 5×10^6, 6×10^6, 7×10^6, 8×10^6, 9×10^6, 1×10^7, 2×10^7, 3×10^7, 4×10^7, 5×10^7, 6×10^7, 7×10^7, 8×10^7, 9×10^7, 1×10^8, 2×10^8, 3×10^8, 4×10^8, 5×10^8, 6×10^8, 7×10^8, 8×10^8, 9×10^8, 1×10^9, 2×10^9, 3×10^9, 4×10^9, 5×10^9, 6×10^9, 7×10^9, 8×10^9, 9×10^9, 1×10^{10}, 2×10^{10}, 3×10^{10}, 4×10^{10}, 5×10^{10}, 6×10^{10}, 7×10^{10}, 8×10^{10}, 9×10^{10}, 1×10^{11}, 2×10^{11}, 3×10^{11}, 4×10^{11}, 5×10^{11}, 6×10^{11}, 7×10^{11}, 8×10^{11}, 9×10^{11}, 1×10^{12}, 2×10^{12}, 3×10^{12}, 4×10^{12}, 5×10^{12}, 6×10^{12}, 7×10^{12}, 8×10^{12}, 9×10^{12}, 1×10^{13}, 2×10^{13}, 3×10^{13}, 4×10^{13}, 5×10^{13}, 6×10^{13}, 7×10^{13}, 8×10^{13} и 9×10^{13}. В одном из вариантов осуществления количество TIL, содержащееся в фармацевтических композициях согласно изобретению, составляет 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}.

[00686] В предпочтительном варианте осуществления экспансия TIL может быть проведена с использованием этапа примирующей первой экспансии (например, как описанные на этапе B на фиг. 1 (в частности, например, фиг. 1B и/или фиг. 1C), который может включать процессы, называемые pre-REP или примирующим REP и которые содержат фидерные клетки с дня 0 и/или с начала культивирования), как описано ниже и в настоящем документе, с последующей быстрой второй экспансией (этап D, включая процессы, называемые этапами протокола быстрой экспансии (REP)), как описано ниже в разделе Этап D и в настоящем документе, с последующей необязательной криоконсервацией и последующим вторым этапом D (включая процессы, называемые этапами рестимуляции REP), как описано ниже и в настоящем документе. TIL, полученные в результате этого процесса, могут быть необязательно охарактеризованы по фенотипическим характеристикам и метаболическим параметрам, как описано в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления фрагмент опухоли составляет приблизительно от 1 $мм^3$ до 10 $мм^3$.

[00687] В некоторых вариантах осуществления первая культуральная среда для экспансии называется «CM», сокращение от «culture media» (культуральной среды). В некоторых вариантах осуществления CM для этапа B состоит из RPMI 1640 с GlutaMAX с добавлением 10% сыворотки человека группы AB, 25 мМ Hepes и 10 мг/мл гентамицина.

[00688] В некоторых вариантах осуществления количество фрагментов опухоли меньше или равно 240. В некоторых вариантах осуществления фрагменты опухоли в количестве, меньшем или равном 240, помещены в 4 или менее контейнеров. В некоторых вариантах осуществления контейнеры представляют собой колбы GREX100 MCS. В некоторых вариантах осуществления 60 или менее фрагментов опухоли помещают в 1 контейнер. В некоторых вариантах осуществления каждый контейнер содержит 500 мл или менее среды на контейнер. В некоторых вариантах осуществления среда содержит IL-2. В некоторых вариантах осуществления среда содержит 6000 МЕ/мл IL-2. В некоторых вариантах осуществления среда содержит антигенпрезентирующие фидерные клетки (также называемые в настоящем документе «антигенпрезентирующими клетками»). В некоторых вариантах осуществления среда содержит $2,5 \times 10^8$ антигенпрезентирующих фидерных клеток на контейнер. В некоторых вариантах осуществления среда содержит OKT-3. В некоторых вариантах осуществления среда содержит 30 нг/мл OKT-3 на контейнер. В некоторых вариантах осуществления контейнер представляет собой колбу GREX100 MCS. В некоторых вариантах осуществления среда содержит 6000 МЕ/мл IL-2, 30 нг OKT-3 и $2,5 \times 10^8$ антигенпрезентирующих фидерных клеток. В некоторых вариантах осуществления среда содержит 6000 МЕ/мл IL-2, 30 нг/мл OKT-3 и $2,5 \times 10^8$ антигенпрезентирующих фидерных клеток на контейнер.

[00689] После приготовления фрагментов опухоли, гидролизатов цельных опухолей и/или суспензий клеток цельных опухолей полученные клетки (т. е. фрагменты и/или

гидролизаты, которые представляют собой первичную популяцию клеток) культивируют в среде, содержащей IL-2, антигенпрезентирующие фидерные клетки и OKT-3, в условиях, которые способствуют росту TIL по сравнению с опухолевыми и другими клетками, и которые позволяют осуществлять примирование TIL и ускоренный рост с начала культивирования в день 0. В некоторых вариантах осуществления гидролизаты опухоли и/или фрагменты опухоли инкубируют с 6000 МЕ/мл IL-2, а также с антигенпрезентирующими фидерными клетками и OKT-3. Эту первичную популяцию клеток культивируют в течение нескольких дней, обычно от 1 до 8 дней, с получением общей популяции TIL, обычно приблизительно 1×10^8 общей массы TIL-клеток. В некоторых вариантах осуществления среда для выращивания во время примирующей первой экспансии содержит IL-2 или его вариант, а также антигенпрезентирующие фидерные клетки и OKT-3. В некоторых вариантах осуществления эту первичную популяцию клеток культивируют в течение нескольких дней, обычно от 1 до 7 дней, с получением общей популяции TIL, обычно приблизительно 1×10^8 общей массы TIL-клеток. В некоторых вариантах осуществления среда для выращивания во время примирующей первой экспансии содержит IL-2 или его вариант, а также антигенпрезентирующие фидерные клетки и OKT-3. В некоторых вариантах осуществления IL-2 представляет собой рекомбинантный IL-2 человека (rhIL-2). В некоторых вариантах осуществления исходный раствор IL-2 имеет удельную активность $20\text{-}30\times10^6$ МЕ/мг для флакона на 1 мг. В некоторых вариантах осуществления исходный раствор IL-2 имеет удельную активность 20×10^6 МЕ/мг для флакона на 1 мг. В некоторых вариантах осуществления исходный раствор IL-2 имеет удельную активность 25×10^6 МЕ/мг для флакона на 1 мг. В некоторых вариантах осуществления исходный раствор IL-2 имеет удельную активность 30×10^6 МЕ/мг для флакона на 1 мг. В некоторых вариантах осуществления исходный раствор IL-2 имеет конечную концентрацию $4\text{-}8\times10^6$ МЕ/мг IL-2. В некоторых вариантах осуществления исходный раствор IL-2 имеет конечную концентрацию $5\text{-}7\times10^6$ МЕ/мг IL-2. В некоторых вариантах осуществления исходный раствор IL-2 имеет конечную концентрацию 6×10^6 МЕ/мг IL-2. В некоторых вариантах осуществления исходный раствор IL-2 готовят, как описано в примере C. В некоторых вариантах осуществления культуральная среда для примирующей первой экспансии содержит приблизительно 10000 МЕ/мл IL-2, приблизительно 9000 МЕ/мл IL-2, приблизительно 8000 МЕ/мл IL-2, приблизительно 7000 МЕ/мл IL-2, приблизительно 6000 МЕ/мл IL-2 или приблизительно 5000 МЕ/мл IL-2. В некоторых вариантах осуществления культуральная среда для примирующей первой экспансии содержит от приблизительно 9000 МЕ/мл IL-2 до приблизительно 5000 МЕ/мл IL-2. В некоторых вариантах осуществления культуральная среда для примирующей первой экспансии содержит от приблизительно 8000 МЕ/мл IL-2 до приблизительно 6000 МЕ/мл IL-2. В некоторых вариантах осуществления культуральная среда для примирующей первой экспансии содержит от приблизительно 7000 МЕ/мл IL-2 до приблизительно 6000 МЕ/мл IL-2. В некоторых вариантах осуществления культуральная среда для примирующей первой экспансии содержит приблизительно 6000 МЕ/мл IL-2. В одном из вариантов

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

[00690] В некоторых вариантах осуществления культуральная среда для примирующей первой экспансии содержит приблизительно 500 МЕ/мл IL-15, приблизительно 400 МЕ/мл IL-15, приблизительно 300 МЕ/мл IL-15, приблизительно 200 МЕ/мл IL-15, приблизительно 180 МЕ/мл IL-15, приблизительно 160 МЕ/мл IL-15, приблизительно 140 МЕ/мл IL-15, приблизительно 120 МЕ/мл IL-15 или приблизительно 100 МЕ/мл IL-15. В некоторых вариантах осуществления культуральная среда для примирующей первой экспансии содержит от приблизительно 500 МЕ/мл IL-15 до приблизительно 100 МЕ/мл IL-15. В некоторых вариантах осуществления культуральная среда для примирующей первой экспансии содержит от приблизительно 400 МЕ/мл IL-15 до приблизительно 100 МЕ/мл IL-15. В некоторых вариантах осуществления культуральная среда для примирующей первой экспансии содержит от приблизительно 300 МЕ/мл IL-15 до приблизительно 100 МЕ/мл IL-15. В некоторых вариантах осуществления культуральная среда для примирующей первой экспансии содержит приблизительно 200 МЕ/мл IL-15. В некоторых вариантах осуществления среда для культивирования клеток для примирующей первой экспансии содержит приблизительно 180 МЕ/мл IL-15. В одном из вариантов осуществления среда для культивирования клеток для примирующей первой экспансии дополнительно содержит IL-15. В предпочтительном варианте осуществления среда для культивирования клеток для примирующей первой экспансии содержит приблизительно 180 МЕ/мл IL-15.

[00691] В некоторых вариантах осуществления культуральная среда для примирующей первой экспансии содержит приблизительно 20 МЕ/мл IL-21, приблизительно 15 МЕ/мл IL-21, приблизительно 12 МЕ/мл IL-21, приблизительно 10 МЕ/мл IL-21, приблизительно 5 МЕ/мл IL-21, приблизительно 4 МЕ/мл IL-21,

приблизительно 3 МЕ/мл IL-21, приблизительно 2 МЕ/мл IL-21, приблизительно 1 МЕ/мл IL-21 или приблизительно 0,5 МЕ/мл IL-21. В некоторых вариантах осуществления культуральная среда для примирующей первой экспансии содержит от приблизительно 20 МЕ/мл IL-21 до приблизительно 0,5 МЕ/мл IL-21. В некоторых вариантах осуществления культуральная среда для примирующей первой экспансии содержит от приблизительно 15 МЕ/мл IL-21 до приблизительно 0,5 МЕ/мл IL-21. В некоторых вариантах осуществления культуральная среда для примирующей первой экспансии содержит от приблизительно 12 МЕ/мл IL-21 до приблизительно 0,5 МЕ/мл IL-21. В некоторых вариантах осуществления культуральная среда для примирующей первой экспансии содержит от приблизительно 10 МЕ/мл IL-21 до приблизительно 0,5 МЕ/мл IL-21. В некоторых вариантах осуществления культуральная среда для примирующей первой экспансии содержит от приблизительно 5 МЕ/мл IL-21 до приблизительно 1 МЕ/мл IL-21. В некоторых вариантах осуществления культуральная среда для примирующей первой экспансии содержит приблизительно 2 МЕ/мл IL-21. В некоторых вариантах осуществления среда для культивирования клеток для примирующей первой экспансии содержит приблизительно 1 МЕ/мл IL-21. В некоторых вариантах осуществления среда для культивирования клеток для примирующей первой экспансии содержит приблизительно 0,5 МЕ/мл IL-21. В одном из вариантов осуществления среда для культивирования клеток дополнительно содержит IL-21. В предпочтительном варианте осуществления среда для культивирования клеток для примирующей первой экспансии содержит приблизительно 1 МЕ/мл IL-21.

[00692] В одном из вариантов осуществления среда для культивирования клеток для примирующей первой экспансии содержит антитело OKT-3. В некоторых вариантах осуществления среда для культивирования клеток для примирующей первой экспансии содержит приблизительно 30 нг/мл антитела OKT-3. В одном из вариантов осуществления среда для культивирования клеток для примирующей первой экспансии 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. В одном из вариантов осуществления среда для культивирования клеток содержит от 0,1 нг/мл до 1 нг/мл, от 1 нг/мл до 5 нг/мл, от 5 нг/мл до 10 нг/мл, от 10 нг/мл до 20 нг/мл, от 20 нг/мл до 30 нг/мл, от 30 нг/мл до 40 нг/мл, от 40 нг/мл до 50 нг/мл и от 50 нг/мл до 100 нг/мл антитела OKT-3. В одном из вариантов осуществления среда для культивирования клеток содержит от 15 нг/мл до 30 нг/мл антитела OKT-3. В одном из вариантов осуществления среда для культивирования клеток содержит 30 нг/мл антитела OKT-3. В некоторых вариантах осуществления антитело OKT-3 представляет собой муромонаб.

ТАБЛИЦА 3: Аминокислотные последовательности муромонаба (пример антитела ОКТ-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

[00693] В некоторых вариантах осуществления среда для культивирования клеток для примирующей первой экспансии содержит один или более агонистов TNFRSF в среде для культивирования клеток. В некоторых вариантах осуществления агонист TNFRSF включает агонист 4-1BB. В некоторых вариантах осуществления агонист TNFRSF представляет собой агонист 4-1BB, и агонист 4-1BB выбран из группы, состоящей из урелумаба, утомилумаба, EU-101, слитого белка, и их фрагментов, производных, вариантов, биоаналогов и комбинаций. В некоторых вариантах осуществления агонист TNFRSF добавляют в концентрации, достаточной для достижения концентрации в среде для культивирования клеток от 0,1 мкг/мл до 100 мкг/мл. В некоторых вариантах осуществления агонист TNFRSF добавляют в концентрации, достаточной для достижения концентрации в среде для культивирования клеток от 20 мкг/мл до 40 мкг/мл.

[00694] В некоторых вариантах осуществления в дополнение к одному или более агонистам TNFRSF среда для культивирования клеток для примирующей первой экспансии дополнительно содержит IL-2 в начальной концентрации приблизительно 3000 МЕ/мл и антитело OKT-3 в начальной концентрации приблизительно 30 нг/мл, и при этом один или более агонистов TNFRSF включают агонист 4-1BB. В некоторых вариантах осуществления в дополнение к одному или более агонистам TNFRSF среда для культивирования клеток для примирующей первой экспансии дополнительно содержит IL-2 в начальной концентрации приблизительно 6000 МЕ/мл и антитело OKT-3 в начальной концентрации приблизительно 30 нг/мл, и при этом один или более агонистов TNFRSF включают агонист 4-1BB.

[00695] В некоторых вариантах осуществления культуральная среда для примирующей первой экспансии называется «CM», сокращение от «culture media» (культуральной среды). В некоторых вариантах осуществления она называется CM1 (культуральная среда 1). В некоторых вариантах осуществления CM состоит из RPMI 1640 с GlutaMAX с добавлением 10% сыворотки человека группы AB, 25 мМ Hepes и 10 мг/мл гентамицина. В некоторых вариантах осуществления CM представляет собой CM1, описанную в разделе примеров, см. пример A. В некоторых вариантах осуществления примирующая первая экспансия происходит в исходной среде для культивирования клеток или в первой среде для культивирования клеток. В некоторых вариантах осуществления культуральная среда для примирующей первой экспансии, или исходная среда для культивирования клеток, или первая среда для культивирования клеток содержит IL-2, OKT-3 и антигенпрезентирующие фидерные клетки (также называемые в настоящем документе фидерными клетками).

[00696] В некоторых вариантах осуществления культуральная среда, используемая в раскрытых в настоящем документе процессах экспансии, представляет собой бессывороточную среду или среду с определенным составом. В некоторых вариантах осуществления бессывороточная среда или среда с определенным составом содержит базальную клеточную среду и сывороточную добавку и/или заменитель сыворотки. В некоторых вариантах осуществления бессывороточная среда или среда с определенным составом используется для предотвращения и/или уменьшения вариаций результатов экспериментов, частично обусловленных вариацией сред, содержащих сыворотку, от партии к партии.

[00697] В некоторых вариантах осуществления бессывороточная среда или среда с определенным составом содержит базальную клеточную среду и сывороточную добавку и/или заменитель сыворотки. В некоторых вариантах осуществления базальная клеточная среда включает, не ограничиваясь перечисленным:базальную среду для экспансии Т-клеток CTS™ OpTmizer™, SFM для экспансии Т-клеток CTS™ OpTmizer™, среду CTS™ AIM-V, SFM среду CTS™ AIM-V, среду без чужеродных компонентов (Xeno-Free) для экспансии Т-клеток LymphoONE™, среду Игла в модификации Дульбекко (DMEM), минимальную питательную среду Игла (MEM), базальную среду Игла (BME), RPMI 1640, F-10, F-12,

минимальную питательную среду (αMEM), минимальную питательную среду Глазго (G-MEM), питательную среду RPMI и среду Дульбекко, модифицированную по способу Исков.

[00698] В некоторых вариантах осуществления сывороточная добавка или заменитель сыворотки включает, не ограничиваясь перечисленным, одно или более из сывороточной добавки для экспансии Т-клеток CTS™ OpTmizer, заменителя сыворотки CTS™ Immune Cell Serum Replacement, один или более альбуминов или заменителей альбумина, одну или более аминокислот, один или более витаминов, один или более трансферринов или заменителей трансферрина, один или более антиоксидантов, один или более инсулинов или заменителей инсулина, один или более предшественников коллагена, один или более антибиотиков и один или более микроэлементов. В некоторых вариантах осуществления 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-аскорбиновой кислоты-2-фосфата, насыщенного железом трансферрина, инсулина и соединений, содержащих компоненты с микроэлементами 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+}. В некоторых вариантах осуществления среда с определенным составом дополнительно содержит L-глутамин, бикарбонат натрия и/или 2-меркаптоэтанол.

[00699] В некоторых вариантах осуществления заменитель сыворотки CTS™OpTmizer™ T-cell Immune Cell Serum Replacement используют с обычными питательными средами, включая, не ограничиваясь перечисленным: базальную среду для экспансии Т-клеток CTS™ OpTmizer™, SFM для экспансии Т-клеток CTS™ OpTmizer™, среду CTS™ AIM-V, SFM среду CST™ AIM-V, среду без чужеродных компонентов (Xeno-Free) для экспансии Т-клеток LymphoONE™, среду Игла в модификации Дульбекко (DMEM), минимальную питательную среду Игла (MEM), базальную среду Игла (BME), RPMI 1640, F-10, F-12, минимальную питательную среду (αMEM), минимальную питательную среду Глазго (G-MEM), питательную среду RPMI и среду Дульбекко, модифицированную по способу Исков.

[00700] В некоторых вариантах осуществления общая концентрация заменителя сыворотки (об.%) в бессывороточной среде или среде с определенным составом составляет приблизительно от 1 об.%, 2 об.%, 3 об.%, 4 об.%, 5 об.%, 6 об.%, 7 об.%, 8 об.%, 9 об.%, 10 об.%, 11 об.%, 12 об.%, 13 об.%, 14 об.%, 15 об.%, 16 об.%, 17 об.%, 18 об.%, 19 об.% или 20 об.% от всей бессывороточной среды или среды с определенным составом. В некоторых вариантах осуществления общая концентрация заменителя сыворотки составляет приблизительно 3 об.% от всего объема бессывороточной среды или среды с определенным составом. В некоторых вариантах осуществления общая концентрация заменителя сыворотки составляет приблизительно 5 об.% от всего объема бессывороточной среды или среды с определенным составом. В некоторых вариантах осуществления общая

концентрация заменителя сыворотки составляет приблизительно 10 об.% от всего объема бессывороточной среды или среды с определенным составом.

[00701] В некоторых вариантах осуществления бессывороточная среда или среда с определенным составом представляет собой SFM для экспансии Т-клеток CTS™ OpTmizer™ (ThermoFisher Scientific). В настоящем изобретении может быть использован любой состав CTS™ OpTmizer™. SFM для экспансии Т-клеток CTS™ OpTmizer™ представляет собой комбинацию 1 л базальной среды для экспансии Т-клеток CTS™ OpTmizer™ и 26 мл добавки для экспансии Т-клеток CTS™ OpTmizer™, которые смешиваются перед использованием. В некоторых вариантах осуществления в SFM для экспансии Т-клеток CTS™ OpTmizer™ добавлено приблизительно 3% заменителя сыворотки CTS™ Immune Cell Serum Replacement (SR) (ThermoFisher Scientific).В некоторых вариантах осуществления в SFM для экспансии Т-клеток CTS™ OpTmizer™ добавлено приблизительно 3% заменителя сыворотки CTS™ Immune Cell Serum Replacement (SR) (ThermoFisher Scientific) вместе с 2-меркаптоэтанолом в количестве 55 мМ.В некоторых вариантах осуществления в SFM для экспансии Т-клеток CTS™ OpTmizer™ добавлено приблизительно 3% заменителя сыворотки CTS™ Immune Cell Serum Replacement (SR) (ThermoFisher Scientific), и конечная концентрация 2-меркаптоэтанола в среде составляет 55 мкМ.

[00702] В некоторых вариантах осуществления среда с определенным составом представляет собой SFM для экспансии Т-клеток CTS™ OpTmizer™ (ThermoFisher Scientific). В настоящем изобретении может быть использован любой состав CTS™ OpTmizer™. SFM для экспансии Т-клеток CTS™ OpTmizer™ представляет собой комбинацию 1 л базальной среды для экспансии Т-клеток CTS™ OpTmizer™ и 26 мл добавки для экспансии Т-клеток CTS™ OpTmizer™, которые смешиваются перед использованием. В некоторых вариантах осуществления в SFM для экспансии Т-клеток CTS™ OpTmizer™ добавлено приблизительно 3% заменителя сыворотки CTS™ Immune Cell Serum Replacement (SR) (ThermoFisher Scientific) вместе с 2-меркаптоэтанолом в количестве 55 мМ. В некоторых вариантах осуществления в SFM для экспансии Т-клеток CTS™OpTmizer™ добавлено приблизительно 3% заменителя сыворотки CTS™ Immune Cell Serum Replacement (SR) (ThermoFisher Scientific), 55 мМ 2-меркаптоэтанола и 2 мМ L-глутамина. В некоторых вариантах осуществления в SFM для экспансии Т-клеток CTS™OpTmizer™ добавлено приблизительно 3% заменителя сыворотки CTS™ Immune Cell Serum Replacement (SR) (ThermoFisher Scientific), 55 мМ 2-меркаптоэтанола и 2 мМ L-глутамина, и среда дополнительно содержит от приблизительно 1000 МЕ/мл до приблизительно 8000 МЕ/мл IL-2. В некоторых вариантах осуществления в SFM для экспансии Т-клеток CTS™OpTmizer™ добавлено приблизительно 3% заменителя сыворотки CTS™ Immune Cell Serum Replacement (SR) (ThermoFisher Scientific), 55 мМ 2-меркаптоэтанола и 2 мМ L-глутамина, и среда дополнительно содержит приблизительно 3000 МЕ/мл IL-2. В некоторых вариантах осуществления в SFM для экспансии Т-клеток CTS™OpTmizer™ добавлено приблизительно 3% заменителя сыворотки CTS™ Immune

Cell Serum Replacement (SR) (ThermoFisher Scientific), 55 мМ 2-меркаптоэтанола и 2 мМ L-глутамина, и среда дополнительно содержит приблизительно 6000 МЕ/мл IL-2. В некоторых вариантах осуществления в SFM для экспансии Т-клеток CTS™OpTmizer™ добавлено приблизительно 3% заменителя сыворотки CTS™ Immune Cell Serum Replacement (SR) (ThermoFisher Scientific) и 55 мМ 2-меркаптоэтанола, и среда дополнительно содержит от приблизительно 1000 МЕ/мл до приблизительно 8000 МЕ/мл IL-2. В некоторых вариантах осуществления в SFM для экспансии Т-клеток CTS™OpTmizer™ добавлено приблизительно 3% заменителя сыворотки CTS™ Immune Cell Serum Replacement (SR) (ThermoFisher Scientific) и 55 мМ 2-меркаптоэтанола, и среда дополнительно содержит приблизительно 3000 МЕ/мл IL-2. В некоторых вариантах осуществления в SFM для экспансии Т-клеток CTS™OpTmizer™ добавлено приблизительно 3% заменителя сыворотки CTS™ Immune Cell Serum Replacement (SR) (ThermoFisher Scientific) и 55 мМ 2-меркаптоэтанола, и среда дополнительно содержит от приблизительно 1000 МЕ/мл до приблизительно 6000 МЕ/мл IL-2. В некоторых вариантах осуществления в SFM для экспансии Т-клеток CTS™OpTmizer™ добавлено приблизительно 3% заменителя сыворотки CTS™ Immune Cell Serum Replacement (SR) (ThermoFisher Scientific) и приблизительно 2 мМ глутамина, и среда дополнительно содержит от приблизительно 1000 МЕ/мл до приблизительно 8000 МЕ/мл IL-2. В некоторых вариантах осуществления в SFM для экспансии Т-клеток CTS™OpTmizer™ добавлено приблизительно 3% заменителя сыворотки CTS™ Immune Cell Serum Replacement (SR) (ThermoFisher Scientific) и приблизительно 2 мМ глутамина, и среда дополнительно содержит приблизительно 3000 МЕ/мл IL-2. В некоторых вариантах осуществления в SFM для экспансии Т-клеток CTS™OpTmizer™ добавлено приблизительно 3% заменителя сыворотки CTS™ Immune Cell Serum Replacement (SR) (ThermoFisher Scientific) и приблизительно 2 мМ глутамина, и среда дополнительно содержит приблизительно 6000 МЕ/мл IL-2.В некоторых вариантах осуществления в SFM для экспансии Т-клеток CTS™ OpTmizer™ добавлено приблизительно 3% заменителя сыворотки CTS™ Immune Cell Serum Replacement (SR) (ThermoFisher Scientific), и конечная концентрация 2-меркаптоэтанола в среде составляет 55 мкМ.

[00703] В некоторых вариантах осуществления в бессывороточную среду или среду с определенным составом добавлен 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. В некоторых вариантах осуществления в бессывороточную среду или среду с определенным составом добавлен глутамин (т. е. GlutaMAX®) в концентрации приблизительно 2 мМ.

[00704] В некоторых вариантах осуществления в бессывороточную среду или среду с определенным составом добавлен 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. В некоторых вариантах осуществления в бессывороточную среду или среду с определенным составом добавлен 2-меркаптоэтанол в концентрации приблизительно 55 мМ.В некоторых вариантах осуществления конечная концентрация 2-меркаптоэтанола в среде составляет 55 мкМ.

[00705] В некоторых вариантах осуществления среды с определенным составом, описанные в публикации международной заявки WO/1998/030679, которая включена в настоящий документ посредством ссылки, подходят для настоящего изобретения. В этой публикации описаны бессывороточные среды для культивирования эукариотических клеток. Бессывороточная среда для культивирования эукариотических клеток включает базальную среду для культивирования клеток, дополненную бессывороточной добавкой, способной поддерживать рост клеток в бессывороточной культуре. Добавка для бессывороточной среды для культивирования эукариотических клеток содержит или получена путем объединения 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 трансферрина, одного или более антиоксидантов, одного или более инсулинов или заменителей инсулина, одного или более предшественников коллагена, одного или более микроэлементов и одного или более антибиотиков. В некоторых вариантах осуществления среда с определенным составом дополнительно содержит L-глутамин, бикарбонат натрия и/или бета-меркаптоэтанол. В некоторых вариантах осуществления 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 трансферрина, одного или более антиоксидантов, одного или более инсулинов или заменителей инсулина, одного или более предшественников коллагена и одного или более микроэлементов. В некоторых вариантах осуществления 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-аскорбиновой кислоты-2-фосфата, насыщенного железом трансферрина, инсулина и соединений, содержащих компоненты с микроэлементами 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+}. В некоторых вариантах осуществления базальная клеточная среда выбрана из группы, состоящей из среды Игла в модификации Дульбекко (DMEM), минимальной питательной среды Игла (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 среды Дульбекко, модифицированной по способу Исков.

[00706] В некоторых вариантах осуществления концентрация глицина в среде с определенным составом составляет 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-аскорбиновой кислоты-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 5000-50000 мг/л.

[00707] В некоторых вариантах осуществления ингредиенты, отличные от компонентов с микроэлементами, присутствуют в среде с определенным составом в диапазонах концентраций, перечисленных в столбце под заголовком «Диапазон концентраций в среде 1X» в приведенной ниже таблице A. В других вариантах осуществления ингредиенты, отличные от компонентов с микроэлементами, присутствуют в среде с определенным составом в конечных концентрациях, перечисленных в столбце под заголовком «Предпочтительный вариант осуществления среды 1X» в приведенной ниже таблице A. В других вариантах осуществления среда с определенным составом представляет собой базальную клеточную среду, содержащую бессывороточную добавку. В некоторых из этих вариантов осуществления бессывороточная добавка содержит ингредиенты, отличные от компонентов с микроэлементами, того типа и в тех концентрациях, которые указаны в столбце под заголовком «Предпочтительный вариант осуществления в добавке» в приведенной ниже таблице A.

Таблица A: Концентрации ингредиентов, отличных от компонентов с микроэлементами

Ингредиент	Предпочтительный вариант осуществления в добавке (мг/л) (Приблизительно)	Диапазон концентраций в среде 1X (мг/л) (Приблизительно)	Предпочтительный вариант осуществления среды 1X (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	83000	5000-50000	12500

[00708] В некоторых вариантах осуществления осмолярность среды с определенным составом составляет от приблизительно 260 до 350 мОсм. В некоторых вариантах осуществления осмолярность составляет от приблизительно 280 до 310 мОсм. В некоторых вариантах осуществления в среду с определенным составом добавлено 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).

[00709] В некоторых вариантах осуществления среды с определенным составом, описанные в 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 настоящего изобретения. Вкратце, RPMI или CTS™ OpTmizer™ использовали в качестве базальной клеточной среды с добавлением 0,

2%, 5% или 10% заменителя сыворотки CTS™ Immune Cell Serum Replacement.

[00710] В одном из вариантов осуществления клеточная среда в первом и/или втором газопроницаемом контейнере является нефильтрованной. Использование нефильтрованной клеточной среды может упростить процедуры, необходимые для увеличения количества клеток. В одном из вариантов осуществления 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).

[00711] В некоторых вариантах осуществления процесс примирующей первой экспансии (включая процессы, такие как, например, описанные на этапе B на фиг. 1 (в частности, например, фиг. 1B и/или фиг. 1C), которые могут включать процессы, иногда называемые pre-REP или примирующей REP) составляет 1-8 дней, как обсуждается в разделе примеров и на фигурах. В некоторых вариантах осуществления процесс примирующей первой экспансии (включая процессы, такие как, например, описанные на этапе B на фиг. 1 (в частности, например, фиг. 1B и/или фиг. 1C), которые могут включать процессы, иногда называемые pre-REP или примирующей REP) составляет 2-8 дней. В некоторых вариантах осуществления процесс примирующей первой экспансии (включая процессы, такие как, например, описанные на этапе B на фиг. 1 (в частности, например, фиг. 1B и/или фиг. 1C), которые могут включать процессы, иногда называемые pre-REP или примирующей REP) составляет 3-8 дней. В некоторых вариантах осуществления процесс примирующей первой экспансии (включая процессы, такие как, например, описанные на этапе B на фиг. 1 (в частности, например, фиг. 1B и/или фиг. 1C), которые могут включать процессы, иногда называемые pre-REP или примирующей REP) составляет 4-8 дней, как обсуждается в разделе примеров и на фигурах. В некоторых вариантах осуществления процесс примирующей первой экспансии (включая процессы, такие как, например, описанные на этапе B на фиг. 1 (в частности, например, фиг. 1B и/или фиг. 1C), которые могут включать процессы, иногда называемые pre-REP или примирующей REP) составляет 1-7 дней, как обсуждается в разделе примеров и на фигурах. В некоторых вариантах осуществления процесс примирующей первой экспансии (включая процессы, такие как, например, описанные на этапе B на фиг. 1 (в частности, например, фиг. 1B и/или фиг. 1C), которые могут включать процессы, иногда называемые pre-REP или примирующей REP) составляет 2-8 дней. В некоторых вариантах осуществления процесс примирующей первой экспансии (включая процессы, такие как, например, описанные на этапе B на фиг. 1 (в частности, например, фиг. 1B и/или фиг. 1C), которые могут включать процессы, иногда называемые pre-REP или примирующей REP) составляет 2-7 дней. В некоторых вариантах осуществления процесс примирующей первой экспансии (включая процессы, такие как, например, описанные на этапе B на фиг. 1 (в частности, например, фиг. 1B и/или фиг. 1C), которые могут включать процессы, иногда называемые pre-REP или примирующей REP) составляет 3-8 дней.В некоторых вариантах осуществления процесс примирующей первой экспансии (включая процессы, такие как, например, описанные на этапе B на фиг. 1 (в частности, например, фиг. 1B и/или фиг. 1C), которые могут включать процессы, иногда

называемые pre-REP или примирующей REP) составляет 3-7 дней. В некоторых вариантах осуществления процесс примирующей первой экспансии (включая процессы, такие как, например, описанные на этапе B на фиг. 1 (в частности, например, фиг. 1B и/или фиг. 1C), которые могут включать процессы, иногда называемые pre-REP или примирующей REP) составляет 4-8 дней. В некоторых вариантах осуществления процесс примирующей первой экспансии (включая процессы, такие как, например, описанные на этапе B на фиг. 1 (в частности, например, фиг. 1B и/или фиг. 1C), которые могут включать процессы, иногда называемые pre-REP или примирующей REP) составляет 4-7 дней. В некоторых вариантах осуществления процесс примирующей первой экспансии (включая процессы, такие как, например, описанные на этапе B на фиг. 1 (в частности, например, фиг. 1B и/или фиг. 1C), которые могут включать процессы, иногда называемые pre-REP или примирующей REP) составляет 5-8 дней. В некоторых вариантах осуществления процесс примирующей первой экспансии (включая процессы, такие как, например, описанные на этапе B на фиг. 1 (в частности, например, фиг. 1B и/или фиг. 1C), которые могут включать процессы, иногда называемые pre-REP или примирующей REP) составляет 5-7 дней. В некоторых вариантах осуществления процесс примирующей первой экспансии (включая процессы, такие как, например, описанные на этапе B на фиг. 1 (в частности, например, фиг. 1B и/или фиг. 1C), которые могут включать процессы, иногда называемые pre-REP или примирующей REP) составляет 6-8 дней. В некоторых вариантах осуществления процесс примирующей первой экспансии (включая процессы, такие как, например, описанные на этапе B на фиг. 1 (в частности, например, фиг. 1B и/или фиг. 1C), которые могут включать процессы, иногда называемые pre-REP или примирующей REP) составляет 6-7 дней. В некоторых вариантах осуществления процесс примирующей первой экспансии (включая процессы, такие как, например, представленные на этапе B на фиг. 1 (в частности, например, фиг. 1B и/или фиг. 1C), которые могут включать процессы, иногда называемые pre-REP или примирующей REP) составляет 7-8 дней. В некоторых вариантах осуществления процесс примирующей первой экспансии (включая процессы, такие как, например, представленные на этапе B на фиг. 1 (в частности, например, фиг. 1B и/или фиг. 1C), которые могут включать процессы, иногда называемые pre-REP или примирующей REP) составляет 8 дней.В некоторых вариантах осуществления процесс примирующей первой экспансии (включая процессы, такие как, например, представленные на этапе B на фиг. 1 (в частности, например, фиг. 1B и/или фиг. 1C), которые могут включать процессы, иногда называемые pre-REP или примирующей REP) составляет 7 дней.

[00712] В некоторых вариантах осуществления примирующая первая экспансия TIL может продолжаться в течение от 1 дня до 8 дней с момента фрагментации и/или начала этапа первой примирующей экспансии. В некоторых вариантах осуществления примирующая первая экспансия TIL может продолжаться в течение от 1 дня до 7 дней с момента фрагментации и/или начала этапа первой примирующей экспансии. В некоторых вариантах осуществления примирующая первая экспансия TIL может продолжаться в течение от 2 дней до 8 дней с момента фрагментации и/или начала этапа первой

примирующей экспансии. В некоторых вариантах осуществления примирующая первая экспансия TIL может продолжаться в течение от 2 дней до 7 дней с момента фрагментации и/или начала этапа первой примирующей экспансии. В некоторых вариантах осуществления примирующая первая экспансия TIL может продолжаться в течение от 3 дней до 8 дней с момента фрагментации и/или начала этапа первой примирующей экспансии. В некоторых вариантах осуществления примирующая первая экспансия TIL может продолжаться в течение от 3 дней до 7 дней с момента фрагментации и/или начала этапа первой примирующей экспансии. В некоторых вариантах осуществления примирующая первая экспансия TIL может продолжаться в течение от 4 дней до 8 дней с момента фрагментации и/или начала этапа первой примирующей экспансии. В некоторых вариантах осуществления примирующая первая экспансия TIL может продолжаться в течение от 4 дней до 7 дней с момента фрагментации и/или начала этапа первой примирующей экспансии. В некоторых вариантах осуществления примирующая первая экспансия TIL может продолжаться в течение от 5 дней до 8 дней с момента фрагментации и/или начала этапа первой примирующей экспансии. В некоторых вариантах осуществления примирующая первая экспансия TIL может продолжаться в течение от 5 дней до 7 дней с момента фрагментации и/или начала этапа первой примирующей экспансии. В некоторых вариантах осуществления примирующая первая экспансия TIL может продолжаться в течение от 6 дней до 8 дней с момента фрагментации и/или начала этапа первой примирующей экспансии.В некоторых вариантах осуществления примирующая первая экспансия TIL может продолжаться в течение от 6 дней до 7 дней с момента фрагментации и/или начала этапа первой примирующей экспансии. В некоторых вариантах осуществления примирующая первая экспансия TIL может продолжаться в течение от 7 до 8 дней с момента фрагментации и/или начала этапа первой примирующей экспансии. В некоторых вариантах осуществления примирующая первая экспансия TIL может продолжаться в течение 8 дней с момента фрагментации и/или начала этапа первой примирующей экспансии.В некоторых вариантах осуществления примирующая первая экспансия TIL может продолжаться в течение 7 дней с момента фрагментации и/или начала этапа первой примирующей экспансии.

[00713] В некоторых вариантах осуществления примирующая первая экспансия 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 или 11 дней. В некоторых вариантах осуществления первая экспансия TIL может продолжаться в течение от 1 дня до 8 дней. В некоторых вариантах осуществления первая экспансия TIL может продолжаться в течение от 1 дня до 7 дней. В некоторых вариантах осуществления первая экспансия TIL может продолжаться в течение от 2 дней до 7 дней. В некоторых вариантах осуществления первая экспансия TIL может продолжаться в течение от 3 дней до 7 дней. В некоторых вариантах осуществления первая экспансия TIL может продолжаться в течение от 4 дней до 7 дней. В некоторых вариантах осуществления первая экспансия TIL может продолжаться в течение от 5 дней до 7 дней. В некоторых вариантах осуществления первая экспансия TIL может продолжаться в течение

от 6 дней до 7 дней. В некоторых вариантах осуществления первая экспансия TIL может продолжаться в течение от 2 дней до 8 дней. В некоторых вариантах осуществления первая экспансия TIL может продолжаться в течение от 3 дней до 8 дней. В некоторых вариантах осуществления первая экспансия TIL может продолжаться в течение от 4 дней до 8 дней. В некоторых вариантах осуществления первая экспансия TIL может продолжаться в течение от 5 дней до 8 дней. В некоторых вариантах осуществления первая экспансия TIL может продолжаться в течение от 6 дней до 8 дней. В некоторых вариантах осуществления первая экспансия TIL может продолжаться в течение от 2 дней до 9 дней. В некоторых вариантах осуществления первая экспансия TIL может продолжаться в течение от 3 дней до 9 дней. В некоторых вариантах осуществления первая экспансия TIL может продолжаться в течение от 4 дней до 9 дней. В некоторых вариантах осуществления первая экспансия TIL может продолжаться в течение от 5 дней до 9 дней. В некоторых вариантах осуществления первая экспансия TIL может продолжаться в течение от 6 дней до 9 дней. В некоторых вариантах осуществления первая экспансия TIL может продолжаться в течение от 2 дней до 10 дней. В некоторых вариантах осуществления первая экспансия TIL может продолжаться в течение от 3 дней до 10 дней. В некоторых вариантах осуществления первая экспансия TIL может продолжаться в течение от 4 дней до 10 дней. В некоторых вариантах осуществления первая экспансия TIL может продолжаться в течение от 5 дней до 10 дней. В некоторых вариантах осуществления первая экспансия TIL может продолжаться в течение от 6 дней до 10 дней. В некоторых вариантах осуществления первая экспансия TIL может продолжаться в течение от 2 дней до 11 дней. В некоторых вариантах осуществления первая экспансия TIL может продолжаться в течение от 3 дней до 11 дней. В некоторых вариантах осуществления первая экспансия TIL может продолжаться в течение от 4 дней до 11 дней. В некоторых вариантах осуществления первая экспансия TIL может продолжаться в течение от 5 дней до 11 дней. В некоторых вариантах осуществления первая экспансия TIL может продолжаться в течение от 6 дней до 11 дней. В некоторых вариантах осуществления первая экспансия TIL может продолжаться в течение 7 дней. В некоторых вариантах осуществления первая экспансия TIL может продолжаться в течение 8 дней. В некоторых вариантах осуществления первая экспансия TIL может продолжаться в течение 9 дней. В некоторых вариантах осуществления первая экспансия TIL может продолжаться в течение 10 дней. В некоторых вариантах осуществления первая экспансия TIL может продолжаться в течение 11 дней.

[00714] В некоторых вариантах осуществления в качестве комбинации во время примирующей первой экспансии используют комбинацию IL-2, IL-7, IL-15 и/или IL-21. В некоторых вариантах осуществления во время примирующей первой экспансии могут быть включены IL-2, IL-7, IL-15 и/или IL-21, а также любые их комбинации, в том числе, например, во время процессов этапа B согласно фиг. 1 (в частности, например, фиг. 1B), а также как описано в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления в качестве комбинации во время примирующей первой экспансии используют комбинацию IL-2, IL-15 и IL-21. В некоторых вариантах осуществления во время процессов этапа B

согласно фиг. 1 (в частности, например, фиг. 1B и/или фиг. 1C), а также как описано в настоящем документе, могут быть включены IL-2, IL-15 и IL-21, а также любые их комбинации.

[00715] В некоторых вариантах осуществления примирующую первую экспансию, например, этап B согласно фиг. 1 (в частности, например, фиг. 1B и/или фиг. 1C), проводят в биореакторе с закрытой системой. В некоторых вариантах осуществления для экспансии TIL используют закрытую систему, как описано в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления используют биореактор. В некоторых вариантах осуществления биореактор используют в качестве контейнера. В некоторых вариантах осуществления используемый биореактор представляет собой, например, G-REX-10 или G-REX-100. В некоторых вариантах осуществления используемый биореактор представляет собой G-REX-100. В некоторых вариантах осуществления используемый биореактор представляет собой G-REX-10.

1. Фидерные клетки и антигенпрезентирующие клетки

[00716] В одном из вариантов осуществления описанные в настоящем документе процедуры примирующей первой экспансии (например, включая экспансию, такую как описанные на этапе B на фиг. 1 (в частности, например, фиг. 1B и/или фиг. 1C), а также экспансии, называемые pre-REP или примирующей REP) не требуют фидерных клеток (также называемых в настоящем документе «антигенпрезентирующими клетками») на момент начала экспансии TIL, а напротив, их добавляют во время примирующей первой экспансии (примирующая REP). В одном из вариантов осуществления описанные в настоящем документе процедуры примирующей первой экспансии (например, включая экспансию, такую как описанные на этапе B на фиг. 1 (в частности, например, фиг. 1B и/или фиг. 1C), а также экспансии, называемые pre-REP или примирующей REP) не требуют фидерных клеток (также называемых в настоящем документе «антигенпрезентирующими клетками») на момент начала экспансии TIL, а напротив, их добавляют во время примирующей первой экспансии в любой момент на протяжении дней 4-8. В одном из вариантов осуществления описанные в настоящем документе процедуры примирующей первой экспансии (например, включая экспансию, такую как описанные на этапе B на фиг. 1 (в частности, например, фиг. 1B и/или фиг. 1C), а также экспансии, называемые pre-REP или примирующей REP) не требуют фидерных клеток (также называемых в настоящем документе «антигенпрезентирующими клетками») на момент начала экспансии TIL, а напротив, их добавляют во время примирующей первой экспансии в любой момент на протяжении дней 4-7. В одном из вариантов осуществления описанные в настоящем документе процедуры примирующей первой экспансии (например, включая экспансию, такую как описанные на этапе B на фиг. 1 (в частности, например, фиг. 1B и/или фиг. 1C), а также экспансии, называемые pre-REP или примирующей REP) не требуют фидерных клеток (также называемых в настоящем документе «антигенпрезентирующими клетками») на момент начала экспансии TIL, а напротив, их добавляют во время примирующей первой экспансии в любой момент на протяжении дней 5-8. В одном из вариантов осуществления

описанные в настоящем документе процедуры примирующей первой экспансии (например, включая экспансию, такую как описанные на этапе B на фиг. 1 (в частности, например, фиг. 1B и/или фиг. 1C), а также экспансии, называемые pre-REP или примирующей REP) не требуют фидерных клеток (также называемых в настоящем документе «антигенпрезентирующими клетками») на момент начала экспансии TIL, а напротив, их добавляют во время примирующей первой экспансии в любой момент на протяжении дней 5-7. В одном из вариантов осуществления описанные в настоящем документе процедуры примирующей первой экспансии (например, включая экспансию, такую как описанные на этапе B на фиг. 1 (в частности, например, фиг. 1B и/или фиг. 1C), а также экспансии, называемые pre-REP или примирующей REP) не требуют фидерных клеток (также называемых в настоящем документе «антигенпрезентирующими клетками») на момент начала экспансии TIL, а напротив, их добавляют во время примирующей первой экспансии в любой момент на протяжении дней 6-8. В одном из вариантов осуществления описанные в настоящем документе процедуры примирующей первой экспансии (например, включая экспансию, такую как описанные на этапе B на фиг. 1 (в частности, например, фиг. 1B и/или фиг. 1C), а также экспансии, называемые pre-REP или примирующей REP) не требуют фидерных клеток (также называемых в настоящем документе «антигенпрезентирующими клетками») на момент начала экспансии TIL, а напротив, их добавляют во время примирующей первой экспансии в любой момент на протяжении дней 6-7. В одном из вариантов осуществления описанные в настоящем документе процедуры примирующей первой экспансии (например, включая экспансию, такую как описанные на этапе B на фиг. 1 (в частности, например, фиг. 1B и/или фиг. 1C), а также экспансии, называемые pre-REP или примирующей REP) не требуют фидерных клеток (также называемых в настоящем документе «антигенпрезентирующими клетками») на момент начала экспансии TIL, а напротив, их добавляют во время примирующей первой экспансии в любой момент на протяжении дня 7 или 8. В одном из вариантов осуществления описанные в настоящем документе процедуры примирующей первой экспансии (например, включая экспансию, такую как описанные на этапе B на фиг. 1 (в частности, например, фиг. 1B и/или фиг. 1C), а также экспансии, называемые pre-REP или примирующей REP) не требуют фидерных клеток (также называемых в настоящем документе «антигенпрезентирующими клетками») на момент начала экспансии TIL, а напротив, их добавляют во время примирующей первой экспансии в любой момент на протяжении дня 7. В одном из вариантов осуществления описанные в настоящем документе процедуры примирующей первой экспансии (например, включая экспансию, такую как описанные на этапе B на фиг. 1 (в частности, например, фиг. 1B и/или фиг. 1C), а также экспансии, называемые pre-REP или примирующей REP) не требуют фидерных клеток (также называемых в настоящем документе «антигенпрезентирующими клетками») на момент начала экспансии TIL, а напротив, их добавляют во время примирующей первой экспансии в любой момент на протяжении дня 8.

[00717] В одном из вариантов осуществления описанные в настоящем документе

процедуры примирующей первой экспансии (например, включая экспансию, такую как описанные на этапе B на фиг. 1 (в частности, например, фиг. 1B и/или фиг. 1C), а также экспансии, называемые pre-REP или примирующей REP) требуют фидерных клеток (также называемых в настоящем документе «антигенпрезентирующими клетками») на момент начала экспансии TIL и во время примирующей первой экспансии. Во многих вариантах осуществления фидерные клетки представляют собой мононуклеарные клетки периферической крови (МНПК), полученные из стандартных единиц цельной крови от аллогенных здоровых доноров крови. МНПК получают с использованием стандартных методов, таких как разделение в градиенте Ficoll-Paque. В некоторых вариантах осуществления во время примирующей первой экспансии используют $2,5 \times 10^8$ фидерных клеток. В некоторых вариантах осуществления во время примирующей первой экспансии используют $2,5 \times 10^8$ фидерных клеток на контейнер. В некоторых вариантах осуществления во время примирующей первой экспансии используют $2,5 \times 10^8$ фидерных клеток на GREX-10. В некоторых вариантах осуществления во время примирующей первой экспансии используют $2,5 \times 10^8$ фидерных клеток на GREX-100.

[00718] Как правило, аллогенные МНПК подвергают инактивации, либо посредством облучения, либо посредством тепловой обработки, и используют в процедурах REP, как описано в разделе примеров, где представлен иллюстративный протокол для оценки неспособности к репликации облученных аллогенных МНПК.

[00719] В некоторых вариантах осуществления изобретения МНПК считаются неспособными к репликации и приемлемыми для применения в процедурах экспансии TIL, описанных в настоящем документе, если общее количество жизнеспособных клеток на день 14 меньше исходного количества жизнеспособных клеток, помещенных в культуру в день 0 примирующей первой экспансии.

[00720] В некоторых вариантах осуществления изобретения МНПК считаются неспособными к репликации и приемлемыми для применения в процедурах экспансии TIL, описанных в настоящем документе, если общее количество жизнеспособных клеток, культивируемых в присутствии OKT3 и IL-2, на день 7 не повысилось относительно исходного количества жизнеспособных клеток, помещенных в культуру в день 0 примирующей первой экспансии. В некоторых вариантах осуществления МНПК культивируют в присутствии 30 нг/мл антитела OKT3 и 3000 МЕ/мл IL-2. В некоторых вариантах осуществления МНПК культивируют в присутствии 30 нг/мл антитела OKT3 и 6000 МЕ/мл IL-2.

[00721] В некоторых вариантах осуществления изобретения МНПК считаются неспособными к репликации и приемлемыми для применения в процедурах экспансии TIL, описанных в настоящем документе, если общее количество жизнеспособных клеток, культивируемых в присутствии OKT3 и IL-2, на день 7 не повысилось относительно исходного количества жизнеспособных клеток, помещенных в культуру в день 0 примирующей первой экспансии. В некоторых вариантах осуществления МНПК культивируют в присутствии 5-60 нг/мл антитела OKT3 и 1000-6000 МЕ/мл IL-2. В

некоторых вариантах осуществления МНПК культивируют в присутствии 10-50 нг/мл антитела OKT3 и 2000-5000 МЕ/мл IL-2. В некоторых вариантах осуществления МНПК культивируют в присутствии 20-40 нг/мл антитела OKT3 и 2000-4000 МЕ/мл IL-2. В некоторых вариантах осуществления МНПК культивируют в присутствии 25-35 нг/мл антитела OKT3 и 2500-3500 МЕ/мл IL-2. В некоторых вариантах осуществления МНПК культивируют в присутствии 30 нг/мл антитела OKT3 и 6000 МЕ/мл IL-2. В некоторых вариантах осуществления МНПК культивируют в присутствии 15 нг/мл антитела OKT3 и 3000 МЕ/мл IL-2. В некоторых вариантах осуществления МНПК культивируют в присутствии 15 нг/мл антитела OKT3 и 6000 МЕ/мл IL-2.

[00722] В некоторых вариантах осуществления антигенпрезентирующие фидерные клетки представляют собой МНПК. В некоторых вариантах осуществления антигенпрезентирующие фидерные клетки представляют собой искусственные антигенпрезентирующие фидерные клетки. В одном из вариантов осуществления соотношение TIL и антигенпрезентирующих фидерных клеток при второй экспансии составляет 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. В одном из вариантов осуществления соотношение TIL и антигенпрезентирующих фидерных клеток при второй экспансии составляет от 1 к 50 до 1 к 300. В одном из вариантов осуществления соотношение TIL и антигенпрезентирующих фидерных клеток при второй экспансии составляет от 1 к 100 до 1 к 200.

[00723] В одном из вариантов осуществления для описанных в настоящем документе процедур примирующей первой экспансии требуется соотношение приблизительно $2,5 \times 10^8$ фидерных клеток на приблизительно 100×10^6 TIL. В еще одном варианте осуществления для описанных в настоящем документе процедур примирующей первой экспансии требуется соотношение приблизительно $2,5 \times 10^8$ фидерных клеток на приблизительно 50×10^6 TIL. В еще одном варианте осуществления для описанной в настоящем документе примирующей первой экспансии требуется приблизительно $2,5 \times 10^8$ фидерных клеток на приблизительно 25×10^6 TIL. В еще одном варианте осуществления для описанной в настоящем документе примирующей первой экспансии требуется приблизительно $2,5 \times 10^8$ фидерных клеток. В еще одном варианте осуществления для примирующей первой экспансии требуется одна четвертая, одна треть, пять двенадцатых или половина от количества фидерных клеток, используемых при быстрой второй экспансии.

[00724] В некоторых вариантах осуществления среда для примирующей первой экспансии содержит IL-2. В некоторых вариантах осуществления среда для примирующей первой экспансии содержит 6000 МЕ/мл IL-2. В некоторых вариантах осуществления среда для примирующей первой экспансии содержит антигенпрезентирующие фидерные клетки.

В некоторых вариантах осуществления среда для примирующей первой экспансии содержит $2,5 \times 10^8$ антигенпрезентирующих фидерных клеток на контейнер. В некоторых вариантах осуществления среда для примирующей первой экспансии содержит OKT-3. В некоторых вариантах осуществления среда содержит 30 нг OKT-3 на контейнер. В некоторых вариантах осуществления контейнер представляет собой колбу GREX100 MCS. В некоторых вариантах осуществления среда содержит 6000 МЕ/мл IL-2, 30 нг/мл OKT-3 и $2,5 \times 10^8$ антигенпрезентирующих фидерных клеток. В некоторых вариантах осуществления среда содержит 6000 МЕ/мл IL-2, 30 нг/мл OKT-3 и $2,5 \times 10^8$ антигенпрезентирующих фидерных клеток на контейнер. В некоторых вариантах осуществления среда содержит 500 мл культуральной среды и 15 мкг OKT-3 на $2,5 \times 10^8$ антигенпрезентирующих фидерных клеток на контейнер. В некоторых вариантах осуществления среда содержит 500 мл культуральной среды и 15 мкг OKT-3 на контейнер. В некоторых вариантах осуществления контейнер представляет собой колбу GREX100 MCS. В некоторых вариантах осуществления среда содержит 500 мл культуральной среды и 6000 МЕ/мл IL-2, 30 нг/мл OKT-3 и $2,5 \times 10^8$ антигенпрезентирующих фидерных клеток. В некоторых вариантах осуществления среда содержит 500 мл культуральной среды и 6000 МЕ/мл IL-2, 15 мкг OKT-3 и $2,5 \times 10^8$ антигенпрезентирующих фидерных клеток на контейнер. В некоторых вариантах осуществления среда содержит 500 мл культуральной среды и 15 мкг OKT-3 на $2,5 \times 10^8$ антигенпрезентирующих фидерных клеток на контейнер.

[00725] В одном из вариантов осуществления описанные в настоящем документе процедуры примирующей первой экспансии требуют избытка фидерных клеток относительно TIL во время второй экспансии. Во многих вариантах осуществления фидерные клетки представляют собой мононуклеарные клетки периферической крови (МНПК), полученные из стандартных единиц цельной крови от аллогенных здоровых доноров крови. МНПК получают с использованием стандартных методов, таких как разделение в градиенте Ficoll-Paque. В одном из вариантов осуществления вместо МНПК используют искусственные антигенпрезентирующие клетки (иАПК).

[00726] Как правило, аллогенные МНПК подвергают инактивации, либо посредством облучения, либо посредством тепловой обработки, и используют в процедурах экспансии TIL, описанных в настоящем документе, включая иллюстративные процедуры, описанные на фигурах и в разделе примеров.

[00727] В одном из вариантов осуществления в примирующей первой экспансии используют искусственные антигенпрезентирующие клетки в качестве замены МНПК или в комбинации с ними.

2. Цитокины

[00728] В описанных в настоящем документе способах экспансии обычно используют культуральные среды с высокими дозами цитокина, в частности, IL-2, как это известно в данной области техники.

[00729] В качестве альтернативы, также возможно использование комбинаций цитокинов для примирующей первой экспансии TIL, с комбинациями двух или более из IL-

2, IL-15 и IL-21, как в целом описано в международной публикации WO 2015/189356 и WO 2015/189357, в явном виде включенных в настоящий документ посредством ссылки в полном объеме. Таким образом, возможные комбинации включают IL-2 и IL-15, IL-2 и IL-21, IL-15 и IL-21 и IL-2, IL-15 и IL-21, причем последняя является особенно подходящей для многих вариантов осуществления. Использование комбинаций цитокинов, в частности, способствует образованию лимфоцитов и, в частности, Т-клеток, как описано в настоящем документе.

ТАБЛИЦА 4: Аминокислотные последовательности интерлейкинов.

Идентификатор	**Последовательность (однобуквенные обозначения аминокислот)**
SEQ ID NO:3 рекомбинантный IL-2 человека(rhIL-2)	MAPTSSSTKK TQLQLEHLLL DLQMILNGIN NYKNPKLTRM LTFKFYMPKK ATELKHLQCL 60 EEELKPLEEV LNLAQSKNFH LRPRDLISNI NVIVLELKGS ETTFMCEYAD ETATIVEFLN 120 RWITFCQSII STLT 134
SEQ ID NO:4 Альдеслейкин	PTSSSTKKTQ LQLEHLLLDL QMILNGINNY KNPKLTRMLT FKFYMPKKAT ELKHLQCLEE 60 ELKPLEEVLN LAQSKNFHLR PRDLISNINV IVLELKGSET TFMCEYADET ATIVEFLNRW 120 ITFSQSIIST LT 132
SEQ ID NO:5 рекомбинантный IL-4 человека (rhIL-4)	MHKCDITLQE IIKTLNSLTE QKTLCTELTV TDIFAASKNT TEKETFCRAA TVLRQFYSHH 60 EKDTRCLGAT AQQFHRHKQL IRFLKRLDRN LWGLAGLNSC PVKEANQSTL ENFLERLKTI 120 MREKYSKCSS 130
SEQ ID NO:6 рекомбинантный IL-7 человека (rhIL-7)	MDCDIEGKDG KQYESVLMVS IDQLLDSMKE IGSNCLNNEF NFFKRHICDA NKEGMFLFRA 60 ARKLRQFLKM NSTGDFDLHL LKVSEGTTIL LNCTGQVKGR KPAALGEAQP TKSLEENKSL 120 KEQKKLNDLC FLKRLLQEIK TCWNKILMGT KEH 153
SEQ ID NO:7 рекомбинантный IL-15 человека (rhIL-15)	MNWVNVISDL KKIEDLIQSM HIDATLYTES DVHPSCKVTA MKCFLLELQV ISLESGDASI 60 HDTVENLIIL ANNSLSSNGN VTESGCKECE ELEEKNIKEF LQSFVHIVQM FINTS 115
SEQ ID NO:8 рекомбинантный	MQDRHMIRMR QLIDIVDQLK NYVNDLVPEF LPAPEDVETN CEWSAFSCFQ KAQLKSANTG 60

IL-21 человека (rhIL-21)	NNERIINVSI KKLKRKPPST NAGRRQKHRL TCPSCDSYEK KPPKEFLERF KSLLQKMIHQ 120 HLSSRTHGSE DS 132

ЭТАП C. Переход от примирующей первой экспансии к быстрой второй экспансии

[00730] В некоторых случаях общая популяция TIL, полученная в результате примирующей первой экспансии (которая может включать экспансии, иногда называемые pre-REP), включая, например, популяцию TIL, полученную, например, в результате этапа B, как показано на фиг. 1 (в частности, например, фиг. 1B и/или фиг. 1C), может быть подвергнута быстрой второй экспансии (которая может включать экспансии, иногда называемые протоколом быстрой экспансии (REP)), а затем криоконсервирована, как обсуждается ниже. Аналогичным образом, в случае, когда генетически модифицированные TIL будут применяться в терапии, подвергнутая экспансии популяция TIL, полученная в результате примирующей первой экспансии, или подвергнутая экспансии популяция TIL, полученная в результате быстрой второй экспансии, могут быть подвергнуты генетическим модификациям для подходящей обработки до этапа экспансии или после примирующей первой экспансии и до быстрой второй экспансии.

[00731] В некоторых вариантах осуществления TIL, полученные в результате примирующей первой экспансии (например, в результате этапа B, как показано на фиг. 1 (в частности, например, фиг. 1B и/или фиг. 1C)), хранят до проведения фенотипирования для отбора. В некоторых вариантах осуществления TIL, полученные в результате примирующей первой экспансии (например, в результате этапа B, как показано на фиг. 1 (в частности, например, фиг. 1B и/или фиг. 1C)), не хранят и сразу же переходят к быстрой второй экспансии. В некоторых вариантах осуществления TIL, полученные в результате примирующей первой экспансии, не криоконсервируют после примирующей первой экспансии и до быстрой второй экспансии. В некоторых вариантах осуществления переход от примирующей первой экспансии ко второй экспансии происходит через приблизительно 2 дня, 3 дня, 4, дня, 5 дней, 6 дней, 7 дней или 8 дней с момента фрагментации опухоли и/или с момента начала этапа первой примирующей экспансии. В некоторых вариантах осуществления переход от примирующей первой экспансии к быстрой второй экспансии происходит через приблизительно от 3 дней до 7 дней с момента фрагментации и/или с момента начала этапа первой примирующей экспансии. В некоторых вариантах осуществления переход от примирующей первой экспансии к быстрой второй экспансии происходит через приблизительно от 3 дней до 8 дней с момента фрагментации и/или с момента начала этапа первой примирующей экспансии. В некоторых вариантах осуществления переход от примирующей первой экспансии ко второй экспансии происходит через приблизительно от 4 дней до 7 дней с момента фрагментации и/или с момента начала этапа первой примирующей экспансии. В некоторых вариантах осуществления переход от примирующей первой экспансии ко второй экспансии

происходит через приблизительно от 4 дней до 8 дней с момента фрагментации и/или с момента начала этапа первой примирующей экспансии. В некоторых вариантах осуществления переход от примирующей первой экспансии ко второй экспансии происходит через приблизительно от 5 дней до 7 дней с момента фрагментации и/или с момента начала этапа первой примирующей экспансии. В некоторых вариантах осуществления переход от примирующей первой экспансии ко второй экспансии происходит через приблизительно от 5 дней до 8 дней с момента фрагментации и/или с момента начала этапа первой примирующей экспансии. В некоторых вариантах осуществления переход от примирующей первой экспансии ко второй экспансии происходит через приблизительно от 6 дней до 7 дней с момента фрагментации и/или с момента начала этапа первой примирующей экспансии. В некоторых вариантах осуществления переход от примирующей первой экспансии ко второй экспансии происходит через приблизительно от 6 дней до 8 дней с момента фрагментации и/или с момента начала этапа первой примирующей экспансии. В некоторых вариантах осуществления переход от примирующей первой экспансии ко второй экспансии происходит через приблизительно от 7 дней до 8 дней с момента фрагментации и/или с момента начала этапа первой примирующей экспансии. В некоторых вариантах осуществления переход от примирующей первой экспансии ко второй экспансии происходит через приблизительно 7 дней с момента фрагментации и/или с момента начала этапа первой примирующей экспансии. В некоторых вариантах осуществления переход от примирующей первой экспансии ко второй экспансии происходит через приблизительно 8 дней с момента фрагментации и/или с момента начала этапа первой примирующей экспансии.

[00732] В некоторых вариантах осуществления переход от примирующей первой экспансии к быстрой второй экспансии происходит через 1 день, 2 дня, 3 дня, 4 дня, 5 дней, 6 дней, 7 дней или 8 дней с момента фрагментации и/или с момента начала этапа первой примирующей экспансии. В некоторых вариантах осуществления переход от примирующей первой экспансии к быстрой второй экспансии происходит через от 1 дня до 7 дней с момента фрагментации и/или с момента начала этапа первой примирующей экспансии. В некоторых вариантах осуществления переход от примирующей первой экспансии к быстрой второй экспансии происходит через от 1 дня до 8 дней с момента фрагментации и/или с момента начала этапа первой примирующей экспансии. В некоторых вариантах осуществления переход от примирующей первой экспансии ко второй экспансии происходит через от 2 дней до 7 дней с момента фрагментации и/или с момента начала этапа первой примирующей экспансии. В некоторых вариантах осуществления переход от примирующей первой экспансии ко второй экспансии происходит через от 2 дней до 8 дней с момента фрагментации и/или с момента начала этапа первой примирующей экспансии. В некоторых вариантах осуществления переход от примирующей первой экспансии ко второй экспансии происходит через от 3 дней до 7 дней с момента фрагментации и/или с момента начала этапа первой примирующей экспансии. В некоторых вариантах осуществления

переход от примирующей первой экспансии ко второй экспансии происходит через от 3 дней до 8 дней с момента фрагментации и/или с момента начала этапа первой примирующей экспансии. В некоторых вариантах осуществления переход от примирующей первой экспансии к быстрой второй экспансии происходит через от 4 дней до 7 дней с момента фрагментации и/или с момента начала этапа первой примирующей экспансии. В некоторых вариантах осуществления переход от примирующей первой экспансии к быстрой второй экспансии происходит через от 4 дней до 8 дней с момента фрагментации и/или с момента начала этапа первой примирующей экспансии. В некоторых вариантах осуществления переход от примирующей первой экспансии к быстрой второй экспансии происходит через от 5 дней до 7 дней с момента фрагментации и/или с момента начала этапа первой примирующей экспансии. В некоторых вариантах осуществления переход от примирующей первой экспансии к быстрой второй экспансии происходит через от 5 дней до 8 дней с момента фрагментации и/или с момента начала этапа первой примирующей экспансии. В некоторых вариантах осуществления переход от примирующей первой экспансии к быстрой второй экспансии происходит через от 6 дней до 7 дней с момента фрагментации и/или с момента начала этапа первой примирующей экспансии. . В некоторых вариантах осуществления переход от примирующей первой экспансии к быстрой второй экспансии происходит через от 6 дней до 8 дней с момента фрагментации и/или с момента начала этапа первой примирующей экспансии. В некоторых вариантах осуществления переход от примирующей первой экспансии к быстрой второй экспансии происходит через от 7 дней до 8 дней с момента фрагментации и/или с момента начала этапа первой примирующей экспансии. В некоторых вариантах осуществления переход от примирующей первой экспансии к быстрой второй экспансии происходит через 7 дней с момента фрагментации и/или с момента начала этапа первой примирующей экспансии. В некоторых вариантах осуществления переход от примирующей первой экспансии к быстрой второй экспансии происходит через 8 дней с момента фрагментации и/или с момента начала этапа первой примирующей экспансии.

[00733] В некоторых вариантах осуществления TIL не хранят после примирующей первой экспансии и до быстрой второй экспансии, и TIL сразу же переходят к быстрой второй экспансии (например, в некоторых вариантах осуществления во время перехода от этапа B к этапу D, как показано на фиг. 1 (в частности, например, фиг. 1B и/или фиг. 1C), отсутствует хранение). В некоторых вариантах осуществления переход происходит в закрытой системе, как описано в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления TIL из примирующей первой экспансии, вторая популяция TIL, сразу же переходят к быстрой второй экспансии без какого-либо переходного периода.

[00734] В некоторых вариантах осуществления переход от примирующей первой экспансии к быстрой второй экспансии, например, этап C согласно фиг. 1 (в частности, например, фиг. 1B), проводят в биореакторе с закрытой системой. В некоторых вариантах осуществления для экспансии TIL используют закрытую систему, как описано в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления используют один биореактор. В

некоторых вариантах осуществления один используемый биореактор представляет собой, например, GREX-10 или GREX-100. В некоторых вариантах осуществления биореактор с закрытой системой представляет собой один биореактор. В некоторых вариантах осуществления переход от примирующей первой экспансии к быстрой второй экспансии предусматривает вертикальное масштабирование размера контейнера. В некоторых вариантах осуществления примирующую первую экспансию проводят в меньшем контейнере, чем быструю вторую экспансию. В некоторых вариантах осуществления примирующую первую экспансию проводят в GREX-100, а быструю вторую экспансию проводят в GREX-500.

[00735] В некоторых вариантах осуществления по окончании первой примирующей экспансии получают не более 1×10^6 TIL-клеток. В некоторых вариантах осуществления по окончании первой примирующей экспансии получают 0,1 $x10^6$, 0,2 $x10^6$, 0,3 $x10^6$, 0,4 $x10^6$, 0,5 $x10^6$, 0,6 $x10^6$, 0,7 $x10^6$, 0,8 $x10^6$, 0,9 $x10^6$, 1,0 $x10^6$, 1,1 $x10^6$, 1,2 $x10^6$, 1,3 $x10^6$, 1,4 $x10^6$ или 0,5 $x10^6$ TIL. В некоторых вариантах осуществления TIL по окончании первой примирующей экспансии являются PD-1+ на от приблизительно 9% до приблизительно 40%. В некоторых вариантах осуществления TIL по окончании первой примирующей экспансии являются PD-1+ на от приблизительно 10% до приблизительно 40%. В некоторых вариантах осуществления TIL по окончании первой примирующей экспансии являются PD-1+ на от приблизительно 15% до приблизительно 30%. В некоторых вариантах осуществления TIL по окончании первой примирующей экспансии являются PD-1+ на от приблизительно 20% до приблизительно 40%. В некоторых вариантах осуществления TIL по окончании первой примирующей экспансии являются PD-1+ на от приблизительно 20% до приблизительно 30%. В некоторых вариантах осуществления TIL по окончании первой примирующей экспансии являются PD-1+ на от приблизительно 10% до приблизительно 20%. В некоторых вариантах осуществления TIL по окончании первой примирующей экспансии являются PD-1+ на приблизительно 9%, приблизительно 10%, приблизительно 15%, приблизительно 20%, приблизительно 25%, приблизительно 30%, приблизительно 35% или приблизительно 40%. В некоторых вариантах осуществления TIL по окончании первой примирующей экспансии являются PD-1high на от приблизительно 9% до приблизительно 40%. В некоторых вариантах осуществления TIL по окончании первой примирующей экспансии являются PD-1high на от приблизительно 15% до приблизительно 30%. В некоторых вариантах осуществления TIL по окончании первой примирующей экспансии являются PD-1high на от приблизительно 20% до приблизительно 40%. В некоторых вариантах осуществления TIL по окончании первой примирующей экспансии являются PD-1high на от приблизительно 20% до приблизительно 30%. В некоторых вариантах осуществления TIL по окончании первой примирующей экспансии являются PD-1high на от приблизительно 10% до приблизительно 20%. В некоторых вариантах осуществления TIL по окончании первой примирующей экспансии являются PD-1high на приблизительно 9%, приблизительно 10%, приблизительно 15%, приблизительно 20%, приблизительно 25%, приблизительно 30%, приблизительно 35% или приблизительно 40%.

ЭТАП D. Быстрая вторая экспансия

[00736] В некоторых вариантах осуществления популяцию TIL-клеток дополнительно увеличивают в численности после сбора и примирующей первой экспансии, после этапа A и этапа B и перехода, называемого этапом C, как показано на фиг. 1 (в частности, например, фиг. 1B и/или фиг. 1C). Эта дополнительная экспансия называется в настоящем документе быстрой второй экспансией, которая может включать в себя процессы экспансии, обычно называемые в данной области техники процессом быстрой экспансии (протокол быстрой экспансии или REP; а также процессы, указанные на этапе D на фиг. 1 (в частности, например, фиг. 1B и/или фиг. 1C)). Быструю вторую экспансию обычно осуществляют с использованием культуральной среды, содержащей ряд компонентов, включая фидерные клетки, источник цитокинов и антитело к CD3, в газопроницаемом контейнере. В некоторых вариантах осуществления через 1 день, 2 дня, 3 дня или 4 дня после начала быстрой второй экспансии (т. е., в дни 8, 9, 10 или 11 всего процесса Gen 3) TIL переносят в контейнер большего объема.

[00737] В некоторых вариантах осуществления в начале быстрой второй экспансии добавляют не более 1×10^6 TIL-клеток. В некоторых вариантах осуществления в начале быстрой второй экспансии добавляют 0,1 $x10^6$, 0,2 $x10^6$, 0,3 $x10^6$, 0,4 $x10^6$, 0,5 $x10^6$, 0,6 $x10^6$, 0,7 $x10^6$, 0,8 $x10^6$, 0,9 $x10^6$, 1,0 $x10^6$, 1,1 $x10^6$, 1,2 $x10^6$, 1,3 $x10^6$, 1,4 $x10^6$ или 0,5 $x10^6$ TIL. В некоторых вариантах осуществления максимальная плотность клеток из примирующей первой экспансии составляет 1e6 клеток, чтобы обеспечить 1e9 для инициации быстрой второй экспансии.

[00738] В некоторых вариантах осуществления быстрая вторая экспансия (которая может включать экспансии, иногда называемые REP; а также процессы, указанные на этапе D на фиг. 1 (в частности, например, фиг. 1B и/или фиг. 1C) TIL может быть проведена с использованием любых колб или контейнеров для TIL, известных специалистам в данной области техники. В некоторых вариантах осуществления вторая экспансия 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 начала быстрой второй экспансии. В некоторых вариантах осуществления вторая экспансия TIL может продолжаться в течение от приблизительно 1 дня до приблизительно 9 дней после начала быстрой второй экспансии. В некоторых вариантах осуществления вторая экспансия TIL может продолжаться в течение от приблизительно 1 дня до приблизительно 10 дней после начала быстрой второй экспансии. В некоторых вариантах осуществления вторая экспансия TIL может продолжаться в течение от приблизительно 2 дней до приблизительно 9 дней после начала быстрой второй экспансии. В некоторых вариантах осуществления вторая экспансия TIL может продолжаться в течение от приблизительно 2 дней до приблизительно 10 дней после начала быстрой второй экспансии. В некоторых вариантах осуществления вторая экспансия TIL может продолжаться в течение от приблизительно 3 дней до приблизительно 9 дней после начала быстрой второй экспансии. В некоторых вариантах осуществления вторая экспансия TIL может продолжаться в течение от приблизительно 3 дней до приблизительно 10 дней

после начала быстрой второй экспансии. В некоторых вариантах осуществления вторая экспансия TIL может продолжаться в течение от приблизительно 4 дней до приблизительно 9 дней после начала быстрой второй экспансии. В некоторых вариантах осуществления вторая экспансия TIL может продолжаться в течение от приблизительно 4 дней до приблизительно 10 дней после начала быстрой второй экспансии. В некоторых вариантах осуществления вторая экспансия TIL может продолжаться в течение от приблизительно 5 дней до приблизительно 9 дней после начала быстрой второй экспансии. В некоторых вариантах осуществления вторая экспансия TIL может продолжаться в течение от приблизительно 5 дней до приблизительно 10 дней после начала быстрой второй экспансии. В некоторых вариантах осуществления вторая экспансия TIL может продолжаться в течение от приблизительно 6 дней до приблизительно 9 дней после начала быстрой второй экспансии. В некоторых вариантах осуществления вторая экспансия TIL может продолжаться в течение от приблизительно 6 дней до приблизительно 10 дней после начала быстрой второй экспансии. В некоторых вариантах осуществления вторая экспансия TIL может продолжаться в течение от приблизительно 7 дней до приблизительно 9 дней после начала быстрой второй экспансии. В некоторых вариантах осуществления вторая экспансия TIL может продолжаться в течение от приблизительно 7 дней до приблизительно 10 дней после начала быстрой второй экспансии. В некоторых вариантах осуществления вторая экспансия TIL может продолжаться в течение от приблизительно 8 дней до приблизительно 9 дней после начала быстрой второй экспансии. В некоторых вариантах осуществления вторая экспансия TIL может продолжаться в течение от приблизительно 8 дней до приблизительно 10 дней после начала быстрой второй экспансии. В некоторых вариантах осуществления вторая экспансия TIL может продолжаться в течение от приблизительно 9 дней до приблизительно 10 дней после начала быстрой второй экспансии. В некоторых вариантах осуществления вторая экспансия TIL может продолжаться в течение приблизительно 1 дня после начала быстрой второй экспансии. В некоторых вариантах осуществления вторая экспансия TIL может продолжаться в течение приблизительно 2 дней после начала быстрой второй экспансии. В некоторых вариантах осуществления вторая экспансия TIL может продолжаться в течение приблизительно 3 дней после начала быстрой второй экспансии. В некоторых вариантах осуществления вторая экспансия TIL может продолжаться в течение приблизительно 4 дней после начала быстрой второй экспансии. В некоторых вариантах осуществления вторая экспансия TIL может продолжаться в течение приблизительно 5 дней после начала быстрой второй экспансии. В некоторых вариантах осуществления вторая экспансия TIL может продолжаться в течение приблизительно 6 дней после начала быстрой второй экспансии. В некоторых вариантах осуществления вторая экспансия TIL может продолжаться в течение приблизительно 7 дней после начала быстрой второй экспансии. В некоторых вариантах осуществления вторая экспансия TIL может продолжаться в течение приблизительно 8 дней после начала быстрой второй экспансии. В некоторых вариантах осуществления вторая экспансия TIL может продолжаться в течение приблизительно 9 дней после начала быстрой второй экспансии. В некоторых вариантах

осуществления вторая экспансия TIL может продолжаться в течение приблизительно 10 дней после начала быстрой второй экспансии.

[00739] В одном из вариантов осуществления быстрая вторая экспансия может быть проведена в газопроницаемом контейнере с использованием способов согласно настоящему изобретению (включая, например, экспансии, называемые REP; а также процессы, указанные на этапе D на фиг. 1 (в частности, например, фиг. 1B и/или фиг. 1C)). В некоторых вариантах осуществления TIL подвергают экспансии при быстрой второй экспансии в присутствии IL-2, OKT-3 и фидерных клеток (также называемых в настоящем документе «антигенпрезентирующими клетками»). В некоторых вариантах осуществления TIL подвергают экспансии при быстрой второй экспансии в присутствии IL-2, OKT-3 и фидерных клеток, где фидерные клетки добавляют до конечной концентрации, в два, 2,4, 2,5, 3, 3,5 или 4 раза превышающей концентрацию фидерных клеток, присутствующую при примирующей первой экспансии. Например, TIL могут быть подвергнуты быстрой экспансии с помощью неспецифической стимуляции Т-клеточного рецептора в присутствии интерлейкина 2 (IL-2) или интерлейкина 15 (IL-15). Неспецифический стимул Т-клеточного рецептора может включать, например, антитело к CD3, например, приблизительно 30 нг/мл OKT3, мышиного моноклонального антитела к CD3 (коммерчески доступно от Ortho-McNeil, Раритан, Нью-Джерси или Miltenyi Biotech, Оберн, Калифорния) или UHCT-1 (коммерчески доступно от BioLegend, Сан-Диего, Калифорния, США). TIL могут быть подвергнуты экспансии для индукции дополнительной стимуляции TIL *in vitro* путем включения одного или более антигенов во время второй экспансии, включая их антигенные части, такие как эпитоп(ы), рака, которые могут быть необязательно экспрессированы из вектора, например, пептида, связывающего лейкоцитарный антиген A2 человека (HLA-A2), например, 0,3 мкМ MART-1: 26-35 (27 л) или gpl 00:209-217 (210 М), необязательно в присутствии фактора роста Т-клеток, например, 300 МЕ/мл IL-2 или IL-15. Другие подходящие антигены могут включать, например, NY-ESO-1, TRP-1, TRP-2, раковый антиген тирозиназы, MAGE-A3, SSX-2 и VEGFR2 или их антигенные части. TIL также могут быть подвергнуты быстрой экспансии путем рестимуляции тем же антигеном(ами) рака, подаваемым на HLA-A2-экспрессирующие антигенпрезентирующие клетки. В качестве альтернативы, TIL могут быть дополнительно рестимулированы, например, облученными аутологичными лимфоцитами или облученными HLA-A2+ аллогенными лимфоцитами и IL-2. В некоторых вариантах осуществления рестимуляция происходит как часть второй экспансии. В некоторых вариантах осуществления вторая экспансия происходит в присутствии облученных аутологичных лимфоцитов или облученных HLA-A2+ аллогенных лимфоцитов и IL-2.

[00740] В одном из вариантов осуществления среда для культивирования клеток дополнительно содержит IL-2. В некоторых вариантах осуществления среда для культивирования клеток содержит приблизительно 3000 МЕ/мл IL-2. В одном из вариантов осуществления среда для культивирования клеток содержит приблизительно 1000 МЕ/мл, приблизительно 1500 МЕ/мл, приблизительно 2000 МЕ/мл, приблизительно 2500 МЕ/мл,

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

[00741] В одном из вариантов осуществления среда для культивирования клеток содержит антитело OKT-3. В некоторых вариантах осуществления среда для культивирования клеток содержит приблизительно 30 нг/мл антитела OKT-3. В одном из вариантов осуществления среда для культивирования клеток содержит приблизительно 0,1 нг/мл, приблизительно 0,5 нг/мл, приблизительно 1 нг/мл, приблизительно 2,5 нг/мл, приблизительно 5 нг/мл, приблизительно 7,5 нг/мл, приблизительно 10 нг/мл, приблизительно 15 нг/мл, приблизительно 20 нг/мл, приблизительно 25 нг/мл, приблизительно 30 нг/мл, приблизительно 35 нг/мл, приблизительно 40 нг/мл, приблизительно 50 нг/мл, приблизительно 60 нг/мл, приблизительно 70 нг/мл, приблизительно 80 нг/мл, приблизительно 90 нг/мл, приблизительно 100 нг/мл, приблизительно 200 нг/мл, приблизительно 500 нг/мл и приблизительно 1 мкг/мл антитела OKT-3. В одном из вариантов осуществления среда для культивирования клеток содержит от 0,1 нг/мл до 1 нг/мл, от 1 нг/мл до 5 нг/мл, от 5 нг/мл до 10 нг/мл, от 10 нг/мл до 20 нг/мл, от 20 нг/мл до 30 нг/мл, от 30 нг/мл до 40 нг/мл, от 40 нг/мл до 50 нг/мл и от 50 нг/мл до 100 нг/мл антитела OKT-3. В одном из вариантов осуществления среда для культивирования клеток содержит от 30 нг/мл до 60 нг/мл антитела OKT-3. В одном из вариантов осуществления среда для культивирования клеток содержит приблизительно 60 нг/мл OKT-3. В некоторых вариантах осуществления антитело OKT-3 представляет собой муромонаб.

[00742] В некоторых вариантах осуществления среда для быстрой второй экспансии содержит IL-2. В некоторых вариантах осуществления среда содержит 6000 МЕ/мл IL-2. В некоторых вариантах осуществления среда для быстрой второй экспансии содержит антигенпрезентирующие фидерные клетки. В некоторых вариантах осуществления среда для быстрой второй экспансии содержит $7,5 \times 10^8$ антигенпрезентирующих фидерных клеток на контейнер. В некоторых вариантах осуществления среда для быстрой второй экспансии содержит OKT-3. В некоторых вариантах осуществления среда для быстрой второй экспансии содержит 500 мл культуральной среды и 30 мкг OKT-3 на контейнер. В некоторых вариантах осуществления контейнер представляет собой колбу GREX100 MCS. В некоторых вариантах осуществления среда для быстрой второй экспансии содержит 6000 МЕ/мл IL-2, 60 нг/мл OKT-3 и $7,5 \times 10^8$ антигенпрезентирующих фидерных клеток. В некоторых вариантах осуществления среда содержит 500 мл культуральной среды и 6000 МЕ/мл IL-2, 30 мкг OKT-3 и $7,5 \times 10^8$ антигенпрезентирующих фидерных клеток на контейнер.

[00743] В некоторых вариантах осуществления среда для быстрой второй экспансии

содержит IL-2. В некоторых вариантах осуществления среда содержит 6000 МЕ/мл IL-2. В некоторых вариантах осуществления среда для быстрой второй экспансии содержит антигенпрезентирующие фидерные клетки. В некоторых вариантах осуществления среда содержит от 5×10^8 до $7,5 \times 10^8$ антигенпрезентирующих фидерных клеток на контейнер. В некоторых вариантах осуществления среда для быстрой второй экспансии содержит OKT-3. В некоторых вариантах осуществления среда для быстрой второй экспансии содержит 500 мл культуральной среды и 30 мкг OKT-3 на контейнер. В некоторых вариантах осуществления контейнер представляет собой колбу GREX100 MCS. В некоторых вариантах осуществления среда для быстрой второй экспансии содержит 6000 МЕ/мл IL-2, 60 нг/мл OKT-3 и от 5×10^8 до $7,5 \times 10^8$ антигенпрезентирующих фидерных клеток. В некоторых вариантах осуществления среда для быстрой второй экспансии содержит 500 мл культуральной среды и 6000 МЕ/мл IL-2, 30 мкг OKT-3 и от 5×10^8 до $7,5 \times 10^8$ антигенпрезентирующих фидерных клеток на контейнер.

[00744] В некоторых вариантах осуществления среда для культивирования клеток содержит один или более агонистов TNFRSF в среде для культивирования клеток. В некоторых вариантах осуществления агонист TNFRSF включает агонист 4-1BB. В некоторых вариантах осуществления агонист TNFRSF представляет собой агонист 4-1BB, и агонист 4-1BB выбран из группы, состоящей из урелумаба, утомилумаба, EU-101, слитого белка, и их фрагментов, производных, вариантов, биоаналогов и комбинаций. В некоторых вариантах осуществления агонист TNFRSF добавляют в концентрации, достаточной для достижения концентрации в среде для культивирования клеток от 0,1 мкг/мл до 100 мкг/мл. В некоторых вариантах осуществления агонист TNFRSF добавляют в концентрации, достаточной для достижения концентрации в среде для культивирования клеток от 20 мкг/мл до 40 мкг/мл.

[00745] В некоторых вариантах осуществления в дополнение к одному или более агонистам TNFRSF среда для культивирования клеток дополнительно содержит IL-2 в начальной концентрации приблизительно 3000 МЕ/мл и антитело OKT-3 в начальной концентрации приблизительно 30 нг/мл, и при этом один или более агонистов TNFRSF включают агонист 4-1BB.

[00746] В некоторых вариантах осуществления в качестве комбинации во время второй экспансии используют комбинацию IL-2, IL-7, IL-15 и/или IL-21. В некоторых вариантах осуществления во время второй экспансии могут быть включены IL-2, IL-7, IL-15 и/или IL-21, а также любые их комбинации, в том числе, например, во время процессов этапа D согласно фиг. 1 (в частности, например, фиг. 1B и/или фиг. 1C), а также как описано в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления в качестве комбинации во время второй экспансии используют комбинацию IL-2, IL-15 и IL-21. В некоторых вариантах осуществления во время процессов этапа D согласно фиг. 1 (в частности, например, фиг. 1B и/или фиг. 1C), а также как описано в настоящем документе, могут быть включены IL-2, IL-15 и IL-21, а также любые их комбинации.

[00747] В некоторых вариантах осуществления вторая экспансия может быть

проведена в среде для культивирования клеток с добавками, содержащей IL-2, OKT-3, антигенпрезентирующие фидерные клетки и, необязательно, агонист TNFRSF. В некоторых вариантах осуществления вторая экспансия происходит в среде для культивирования клеток с добавками. В некоторых вариантах осуществления среда для культивирования клеток с добавками содержит IL-2, OKT-3 и антигенпрезентирующие фидерные клетки. В некоторых вариантах осуществления вторая среда для культивирования клеток содержит IL-2, OKT-3 и антигенпрезентирующие клетки (АПК; также называемые антигенпрезентирующими фидерными клетками). В некоторых вариантах осуществления вторая экспансия происходит в среде для культивирования клеток, содержащей IL-2, OKT-3 и антигенпрезентирующие фидерные клетки (т. е. антигенпрезентирующие клетки).

[00748] В некоторых вариантах осуществления культуральная среда для второй экспансии содержит приблизительно 500 МЕ/мл IL-15, приблизительно 400 МЕ/мл IL-15, приблизительно 300 МЕ/мл IL-15, приблизительно 200 МЕ/мл IL-15, приблизительно 180 МЕ/мл IL-15, приблизительно 160 МЕ/мл IL-15, приблизительно 140 МЕ/мл IL-15, приблизительно 120 МЕ/мл IL-15 или приблизительно 100 МЕ/мл IL-15. В некоторых вариантах осуществления культуральная среда для второй экспансии содержит от приблизительно 500 МЕ/мл IL-15 до приблизительно 100 МЕ/мл IL-15. В некоторых вариантах осуществления культуральная среда для второй экспансии содержит от приблизительно 400 МЕ/мл IL-15 до приблизительно 100 МЕ/мл IL-15. В некоторых вариантах осуществления культуральная среда для второй экспансии содержит от приблизительно 300 МЕ/мл IL-15 до приблизительно 100 МЕ/мл IL-15. В некоторых вариантах осуществления вторая культуральная среда для второй экспансии содержит приблизительно 200 МЕ/мл IL-15. В некоторых вариантах осуществления среда для культивирования клеток содержит приблизительно 180 МЕ/мл IL-15. В одном из вариантов осуществления среда для культивирования клеток дополнительно содержит IL-15. В предпочтительном варианте осуществления среда для культивирования клеток содержит приблизительно 180 МЕ/мл IL-15.

[00749] В некоторых вариантах осуществления культуральная среда для второй экспансии содержит приблизительно 20 МЕ/мл IL-21, приблизительно 15 МЕ/мл IL-21, приблизительно 12 МЕ/мл IL-21, приблизительно 10 МЕ/мл IL-21, приблизительно 5 МЕ/мл IL-21, приблизительно 4 МЕ/мл IL-21, приблизительно 3 МЕ/мл IL-21, приблизительно 2 МЕ/мл IL-21, приблизительно 1 МЕ/мл IL-21 или приблизительно 0,5 МЕ/мл IL-21. В некоторых вариантах осуществления культуральная среда для второй экспансии содержит от приблизительно 20 МЕ/мл IL-21 до приблизительно 0,5 МЕ/мл IL-21. В некоторых вариантах осуществления культуральная среда для второй экспансии содержит от приблизительно 15 МЕ/мл IL-21 до приблизительно 0,5 МЕ/мл IL-21. В некоторых вариантах осуществления культуральная среда для второй экспансии содержит от приблизительно 12 МЕ/мл IL-21 до приблизительно 0,5 МЕ/мл IL-21. В некоторых вариантах осуществления культуральная среда для второй экспансии содержит от

приблизительно 10 МЕ/мл IL-21 до приблизительно 0,5 МЕ/мл IL-21. В некоторых вариантах осуществления культуральная среда для второй экспансии содержит от приблизительно 5 МЕ/мл IL-21 до приблизительно 1 МЕ/мл IL-21. В некоторых вариантах осуществления культуральная среда для второй экспансии содержит приблизительно 2 МЕ/мл IL-21. В некоторых вариантах осуществления среда для культивирования клеток содержит приблизительно 1 МЕ/мл IL-21. В некоторых вариантах осуществления среда для культивирования клеток содержит приблизительно 0,5 МЕ/мл IL-21. В одном из вариантов осуществления среда для культивирования клеток дополнительно содержит IL-21. В предпочтительном варианте осуществления среда для культивирования клеток содержит приблизительно 1 МЕ/мл IL-21.

[00750] В некоторых вариантах осуществления антигенпрезентирующие фидерные клетки (АПК) представляют собой МНПК. В одном из вариантов осуществления соотношение TIL МНПК и/или антигенпрезентирующих клеток при быстрой экспансии и/иливторой экспансии составляет приблизительно 1 к 10, приблизительно 1 к 15, приблизительно 1 к 20, приблизительно 1 к 25, приблизительно 1 к 30, приблизительно 1 к 35, приблизительно 1 к 40, приблизительно 1 к 45, приблизительно 1 к 50, приблизительно 1 к 75, 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. В одном из вариантов осуществления соотношение TIL и МНПК при быстрой экспансии и/или второй экспансии составляет от 1 к 50 до 1 к 300. В одном из вариантов осуществления соотношение TIL и МНПК при быстрой экспансии и/или второй экспансии составляет от 1 к 100 до 1 к 200.

[00751] В одном из вариантов осуществления REP и/или быструю вторую экспансию проводят в колбах, в которых общую массу TIL смешивают со 100- или 200-кратным избытком инактивированных фидерных клеток, где концентрация фидерных клеток по меньшей мере в 1,1 раз (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 раз превышает концентрацию фидерных клеток при примирующей первой экспансии, 30 нг/мл антитела к CD3 OKT3 и 6000 МЕ/мл IL-2 в 150 мл среды. Осуществляют замену среды (обычно замену 2/3 среды путем аспирации 2/3 отработанной среды и замены равным объемом свежей среды) до тех пор, пока клетки не будут перенесены в альтернативную камеру для выращивания. Альтернативные камеры для выращивания включают колбы G-REX и газопроницаемые контейнеры, как более подробно обсуждается ниже.

[00752] В некоторых вариантах осуществления быстрая вторая экспансия (которая может включать процессы, называемые процессом REP) составляет 7-9 дней, как обсуждается в разделе примеров и на фигурах. В некоторых вариантах осуществления вторая экспансия составляет 7 дней. В некоторых вариантах осуществления вторая

экспансия составляет 8 дней. В некоторых вариантах осуществления вторая экспансия составляет 9 дней.

[00753] В одном из вариантов осуществления вторая экспансия (которое может включать экспансии, называемые REP, а также экспансии, указанные на этапе D на фиг. 1 (в частности, например, фиг. 1B и/или фиг. 1C) может быть проведена в газопроницаемых колбах емкостью 500 мл с газопроницаемыми кремниевыми донышами на 100 см (G-Rex 100, коммерчески доступные от Wilson Wolf Manufacturing Corporation, Нью-Брайтон, Миннесота, США), 5×10^6 или 10×10^6 TIL могут быть культивированы с МНПК в 400 мл среды 50/50 с добавлением 5% сыворотки человека группы AB, 3000 МЕ на мл IL-2 и 60 нг на мл антитела к CD3 (OKT3). Колбы G-Rex 100 могут быть инкубированы при 37°C в 5% CO_2. На день 5 250 мл супернатанта может быть изъято, помещено в центрифужные флаконы и центрифугировано при 1500 об/мин ($491 \times g$) в течение 10 минут. Осадки TIL могут быть повторно суспендированы в 150 мл свежей среды с 5% сыворотки человека группы AB, 6000 МЕ на мл IL-2, и добавлены обратно в исходные колбы GREX-100. При последовательной экспансии TIL в колбах GREX-100 на 10 или 11 день TIL могут быть перемещены в колбу большего размера, такую как GREX-500. Клетки могут быть собраны на день 14 культивирования. Клетки могут быть собраны на день 15 культивирования. Клетки могут быть собраны на день 16 культивирования. В некоторых вариантах осуществления замену среды проводят до тех пор, пока клетки не будут перенесены в альтернативную камеру для выращивания. В некоторых вариантах осуществления 2/3 среды заменяют путем аспирации 2/3 отработанной среды и замены равным объемом свежей среды. В некоторых вариантах осуществления альтернативные камеры для выращивания включают колбы GREX и газопроницаемые контейнеры, как более подробно обсуждается ниже.

[00754] В некоторых вариантах осуществления культуральная среда, используемая в раскрытых в настоящем документе процессах экспансии, представляет собой бессывороточную среду или среду с определенным составом. В некоторых вариантах осуществления бессывороточная среда или среда с определенным составом содержит базальную клеточную среду и сывороточную добавку и/или заменитель сыворотки. В некоторых вариантах осуществления бессывороточная среда или среда с определенным составом используется для предотвращения и/или уменьшения вариаций результатов экспериментов, частично обусловленных вариацией сред, содержащих сыворотку, от партии к партии.

[00755] В некоторых вариантах осуществления бессывороточная среда или среда с определенным составом содержит базальную клеточную среду и сывороточную добавку и/или заменитель сыворотки. В некоторых вариантах осуществления базальная клеточная среда включает, не ограничиваясь перечисленным:базальную среду для экспансии Т-клеток CTS™ OpTmizer™, SFM для экспансии Т-клеток CTS™ OpTmizer™, среду CTS™ AIM-V, SFM среду CTS™ AIM-V, среду без чужеродных компонентов (Xeno-Free) для экспансии Т-клеток LymphoONE™, среду Игла в модификации Дульбекко (DMEM), минимальную

питательную среду Игла (MEM), базальную среду Игла (BME), RPMI 1640, F-10, F-12, минимальную питательную среду (αMEM), минимальную питательную среду Глазго (G-MEM), питательную среду RPMI и среду Дульбекко, модифицированную по способу Исков.

[00756] В некоторых вариантах осуществления сывороточная добавка или заменитель сыворотки включает, не ограничиваясь перечисленным, одно или более из сывороточной добавки для экспансии Т-клеток CTS™ OpTmizer, заменителя сыворотки CTS™ Immune Cell Serum Replacement, один или более альбуминов или заменителей альбумина, одну или более аминокислот, один или более витаминов, один или более трансферринов или заменителей трансферрина, один или более антиоксидантов, один или более инсулинов или заменителей инсулина, один или более предшественников коллагена, один или более антибиотиков и один или более микроэлементов. В некоторых вариантах осуществления 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-аскорбиновой кислоты-2-фосфата, насыщенного железом трансферрина, инсулина и соединений, содержащих компоненты с микроэлементами 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+}. В некоторых вариантах осуществления среда с определенным составом дополнительно содержит L-глутамин, бикарбонат натрия и/или 2-меркаптоэтанол.

[00757] В некоторых вариантах осуществления заменитель сыворотки CTS™OpTmizer™ T-cell Immune Cell Serum Replacement используют с обычными питательными средами, включая, не ограничиваясь перечисленным: базальную среду для экспансии Т-клеток CTS™ OpTmizer™, SFM для экспансии Т-клеток CTS™ OpTmizer™, среду CTS™ AIM-V, SFM среду CST™ AIM-V, среду без чужеродных компонентов (Xeno-Free) для экспансии Т-клеток LymphoONE™, среду Игла в модификации Дульбекко (DMEM), минимальную питательную среду Игла (MEM), базальную среду Игла (BME), RPMI 1640, F-10, F-12, минимальную питательную среду (αMEM), минимальную питательную среду Глазго (G-MEM), питательную среду RPMI и среду Дульбекко, модифицированную по способу Исков.

[00758] В некоторых вариантах осуществления общая концентрация заменителя сыворотки (об.%) в бессывороточной среде или среде с определенным составом составляет приблизительно от 1 об.%, 2 об.%, 3 об.%, 4 об.%, 5 об.%, 6 об.%, 7 об.%, 8 об.%, 9 об.%, 10 об.%, 11 об.%, 12 об.%, 13 об.%, 14 об.%, 15 об.%, 16 об.%, 17 об.%, 18 об.%, 19 об.% или 20 об.% от всей бессывороточной среды или среды с определенным составом. В некоторых вариантах осуществления общая концентрация заменителя сыворотки составляет приблизительно 3 об.% от всего объема бессывороточной среды или среды с определенным составом. В некоторых вариантах осуществления общая концентрация заменителя сыворотки составляет приблизительно 5 об.% от всего объема бессывороточной

среды или среды с определенным составом. В некоторых вариантах осуществления общая концентрация заменителя сыворотки составляет приблизительно 10 об.% от всего объема бессывороточной среды или среды с определенным составом.

[00759] В некоторых вариантах осуществления бессывороточная среда или среда с определенным составом представляет собой SFM для экспансии Т-клеток CTS™ OpTmizer™ (ThermoFisher Scientific). В настоящем изобретении может быть использован любой состав CTS™ OpTmizer™. SFM для экспансии Т-клеток CTS™ OpTmizer™ представляет собой комбинацию 1 л базальной среды для экспансии Т-клеток CTS™ OpTmizer™ и 26 мл добавки для экспансии Т-клеток CTS™ OpTmizer™, которые смешиваются перед использованием. В некоторых вариантах осуществления в SFM для экспансии Т-клеток CTS™ OpTmizer™ добавлено приблизительно 3% заменителя сыворотки CTS™ Immune Cell Serum Replacement (SR) (ThermoFisher Scientific) вместе с 2-меркаптоэтанолом в количестве 55 мМ.

[00760] В некоторых вариантах осуществления среда с определенным составом представляет собой SFM для экспансии Т-клеток CTS™ OpTmizer™ (ThermoFisher Scientific). В настоящем изобретении может быть использован любой состав CTS™ OpTmizer™. SFM для экспансии Т-клеток CTS™ OpTmizer™ представляет собой комбинацию 1 л базальной среды для экспансии Т-клеток CTS™ OpTmizer™ и 26 мл добавки для экспансии Т-клеток CTS™ OpTmizer™, которые смешиваются перед использованием. В некоторых вариантах осуществления в SFM для экспансии Т-клеток CTS™ OpTmizer™ добавлено приблизительно 3% заменителя сыворотки CTS™ Immune Cell Serum Replacement (SR) (ThermoFisher Scientific) вместе с 2-меркаптоэтанолом в количестве 55 мМ. В некоторых вариантах осуществления в SFM для экспансии Т-клеток CTS™OpTmizer™ добавлено приблизительно 3% заменителя сыворотки CTS™ Immune Cell Serum Replacement (SR) (ThermoFisher Scientific), 55 мМ 2-меркаптоэтанола и 2 мМ L-глутамина. В некоторых вариантах осуществления в SFM для экспансии Т-клеток CTS™OpTmizer™ добавлено приблизительно 3% заменителя сыворотки CTS™ Immune Cell Serum Replacement (SR) (ThermoFisher Scientific), 55 мМ 2-меркаптоэтанола и 2 мМ L-глутамина, и среда дополнительно содержит от приблизительно 1000 МЕ/мл до приблизительно 8000 МЕ/мл IL-2. В некоторых вариантах осуществления в SFM для экспансии Т-клеток CTS™OpTmizer™ добавлено приблизительно 3% заменителя сыворотки CTS™ Immune Cell Serum Replacement (SR) (ThermoFisher Scientific), 55 мМ 2-меркаптоэтанола и 2 мМ L-глутамина, и среда дополнительно содержит приблизительно 3000 МЕ/мл IL-2. В некоторых вариантах осуществления в SFM для экспансии Т-клеток CTS™OpTmizer™ добавлено приблизительно 3% заменителя сыворотки CTS™ Immune Cell Serum Replacement (SR) (ThermoFisher Scientific), 55 мМ 2-меркаптоэтанола и 2 мМ L-глутамина, и среда дополнительно содержит приблизительно 6000 МЕ/мл IL-2. В некоторых вариантах осуществления в SFM для экспансии Т-клеток CTS™OpTmizer™ добавлено приблизительно 3% заменителя сыворотки CTS™ Immune Cell Serum Replacement (SR) (ThermoFisher Scientific) и 55 мМ 2-меркаптоэтанола, и среда

дополнительно содержит от приблизительно 1000 МЕ/мл до приблизительно 8000 МЕ/мл IL-2. В некоторых вариантах осуществления в SFM для экспансии Т-клеток CTS™OpTmizer™ добавлено приблизительно 3% заменителя сыворотки CTS™ Immune Cell Serum Replacement (SR) (ThermoFisher Scientific) и 55 мМ 2-меркаптоэтанола, и среда дополнительно содержит приблизительно 3000 МЕ/мл IL-2. В некоторых вариантах осуществления в SFM для экспансии Т-клеток CTS™OpTmizer™ добавлено приблизительно 3% заменителя сыворотки CTS™ Immune Cell Serum Replacement (SR) (ThermoFisher Scientific) и 55 мМ 2-меркаптоэтанола, и среда дополнительно содержит от приблизительно 1000 МЕ/мл до приблизительно 6000 МЕ/мл IL-2. В некоторых вариантах осуществления в SFM для экспансии Т-клеток CTS™OpTmizer™ добавлено приблизительно 3% заменителя сыворотки CTS™ Immune Cell Serum Replacement (SR) (ThermoFisher Scientific) и приблизительно 2 мМ глутамина, и среда дополнительно содержит от приблизительно 1000 МЕ/мл до приблизительно 8000 МЕ/мл IL-2. В некоторых вариантах осуществления в SFM для экспансии Т-клеток CTS™OpTmizer™ добавлено приблизительно 3% заменителя сыворотки CTS™ Immune Cell Serum Replacement (SR) (ThermoFisher Scientific) и приблизительно 2 мМ глутамина, и среда дополнительно содержит приблизительно 3000 МЕ/мл IL-2. В некоторых вариантах осуществления в SFM для экспансии Т-клеток CTS™OpTmizer™ добавлено приблизительно 3% заменителя сыворотки CTS™ Immune Cell Serum Replacement (SR) (ThermoFisher Scientific) и приблизительно 2 мМ глутамина, и среда дополнительно содержит приблизительно 6000 МЕ/мл IL-2. В некоторых вариантах осуществления в SFM для экспансии Т-клеток CTS™ OpTmizer™ добавлено приблизительно 3% заменителя сыворотки CTS™ Immune Cell Serum Replacement (SR) (ThermoFisher Scientific), и конечная концентрация 2-меркаптоэтанола в среде составляет 55 мкМ. В некоторых вариантах осуществления в бессывороточную среду или среду с определенным составом добавлен 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. В некоторых вариантах осуществления в бессывороточную среду или среду с определенным составом добавлен глутамин (т. е. GlutaMAX®) в концентрации приблизительно 2 мМ.

[00761] В некоторых вариантах осуществления в бессывороточную среду или среду с определенным составом добавлен 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. В некоторых вариантах осуществления в бессывороточную среду или среду с определенным составом добавлен 2-меркаптоэтанол в

концентрации приблизительно 55 мМ.

[00762] В некоторых вариантах осуществления среды с определенным составом, описанные в публикации международной заявки WO/1998/030679, которая включена в настоящий документ посредством ссылки, подходят для настоящего изобретения. В этой публикации описаны бессывороточные среды для культивирования эукариотических клеток. Бессывороточная среда для культивирования эукариотических клеток включает базальную среду для культивирования клеток, дополненную бессывороточной добавкой, способной поддерживать рост клеток в бессывороточной культуре. Добавка для бессывороточной среды для культивирования эукариотических клеток содержит или получена путем объединения 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 трансферрина, одного или более антиоксидантов, одного или более инсулинов или заменителей инсулина, одного или более предшественников коллагена, одного или более микроэлементов и одного или более антибиотиков. В некоторых вариантах осуществления среда с определенным составом дополнительно содержит L-глутамин, бикарбонат натрия и/или бета-меркаптоэтанол. В некоторых вариантах осуществления 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 трансферрина, одного или более антиоксидантов, одного или более инсулинов или заменителей инсулина, одного или более предшественников коллагена и одного или более микроэлементов. В некоторых вариантах осуществления 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-аскорбиновой кислоты-2-фосфата, насыщенного железом трансферрина, инсулина и соединений, содержащих компоненты с микроэлементами 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+}. В некоторых вариантах осуществления базальная клеточная среда выбрана из группы, состоящей из среды Игла в модификации Дульбекко (DMEM), минимальной питательной среды Игла (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 среды Дульбекко, модифицированной по способу Исков.

[00763] В некоторых вариантах осуществления концентрация глицина в среде с определенным составом составляет 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-аскорбиновой кислоты-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 5000-50000 мг/л.

[00764] В некоторых вариантах осуществления ингредиенты, отличные от компонентов с микроэлементами, присутствуют в среде с определенным составом в диапазонах концентраций, перечисленных в столбце под заголовком «Диапазон концентраций в среде 1X» в приведенной ниже таблице A. В других вариантах осуществления ингредиенты, отличные от компонентов с микроэлементами, присутствуют в среде с определенным составом в конечных концентрациях, перечисленных в столбце под заголовком «Предпочтительный вариант осуществления среды 1X» в приведенной ниже таблице A. В других вариантах осуществления среда с определенным составом представляет собой базальную клеточную среду, содержащую бессывороточную добавку. В некоторых из этих вариантов осуществления бессывороточная добавка содержит ингредиенты, отличные от компонентов с микроэлементами, того типа и в тех концентрациях, которые указаны в столбце под заголовком «Предпочтительный вариант осуществления в добавке» в приведенной ниже таблице A.

Таблица A: Концентрации ингредиентов, отличных от компонентов с микроэлементами

Ингредиент	Предпочтительный вариант осуществления в добавке (мг/л) (Приблизительно)	Диапазон концентраций в среде 1X (мг/л) (Приблизительно)	Предпочтительный вариант осуществления среды 1X (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	83000	5000-50000	12500

[00765] В некоторых вариантах осуществления осмолярность среды с определенным составом составляет от приблизительно 260 до 350 мОсм. В некоторых вариантах осуществления осмолярность составляет от приблизительно 280 до 310 мОсм. В некоторых вариантах осуществления в среду с определенным составом добавлено 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).

[00766] В некоторых вариантах осуществления среды с определенным составом, описанные в 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 настоящего изобретения. Вкратце, RPMI или CTS™ OpTmizer™ использовали в качестве базальной клеточной среды с добавлением 0, 2%, 5% или 10% заменителя сыворотки CTS™ Immune Cell Serum Replacement.

[00767] В одном из вариантов осуществления клеточная среда в первом и/или втором газопроницаемом контейнере является нефильтрованной. Использование нефильтрованной клеточной среды может упростить процедуры, необходимые для увеличения количества клеток. В одном из вариантов осуществления 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).

[00768] В одном из вариантов осуществления проводят быструю вторую экспансию (включая экспансии, называемые REP), и она дополнительно включает этап, на котором осуществляют отбор TIL по наилучшей противоопухолевой реактивности. Может быть использован любой метод отбора, известный в данной области техники. Например, для отбора TIL по наилучшей противоопухолевой реактивности можно применять способы, описанные в публикации заявки на патент США № 2016/0010058 A1, содержание которой включено в настоящий документ посредством ссылки.

[00769] Необязательно, после быстрой второй экспансии (включая экспансии, называемые экспансией REP) может быть проведен анализ жизнеспособности клеток с использованием стандартных анализов, известных в данной области техники. Например, на образце общей массы TIL может быть проведен анализ по вытеснению трипанового синего, который избирательно маркирует мертвые клетки и позволяет оценить жизнеспособность. В некоторых вариантах осуществления клетки в образцах TIL могут быть подсчитаны и подвергнуты определению жизнеспособности с помощью автоматического счетчика клеток Cellometer K2 (Nexcelom Bioscience, Лоренс, Массачусетс). В некоторых вариантах осуществления жизнеспособность определяют в соответствии со стандартным протоколом автоматического счетчика клеток Cellometer K2 Image Cytometer.

[00770] Различные антигенные рецепторы Т- и В-лимфоцитов продуцируются соматической рекомбинацией ограниченного, но большого числа генных сегментов. Эти генные сегменты: V (от англ. variable - вариабельный), D (от англ. diversity - разнообразие), J (от англ. joining - соединяющий) и C (от англ. constant - константный) определяют специфичность связывания и последующие сферы применения иммуноглобулинов и Т-клеточных рецепторов (TCR). Настоящее изобретение обеспечивает способ создания TIL, которые демонстрируют и увеличивают разнообразие репертуара Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления TIL, полученные настоящим способом, демонстрируют увеличение разнообразия репертуара Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления TIL, полученные при второй экспансии, демонстрируют увеличение разнообразия репертуара Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления увеличение разнообразия представляет собой увеличение разнообразия иммуноглобулинов и/или разнообразия Т-клеточных рецепторов. В некоторых вариантах осуществления разнообразие имеет место в иммуноглобулинах, а именно, в тяжелой цепи иммуноглобулина. В некоторых вариантах осуществления разнообразие имеет место в иммуноглобулинах, а именно, в легкой цепи иммуноглобулина. В некоторых вариантах осуществления разнообразие имеет место в Т-клеточных рецепторах. В некоторых вариантах осуществления разнообразие имеет место в одном из Т-клеточных рецепторов, выбранных из группы, состоящей из рецепторов альфа, бета, гамма и дельта. В некоторых вариантах осуществления наблюдается увеличение экспрессии Т-клеточного рецептора (TCR) альфа и/или бета. В некоторых вариантах осуществления наблюдается увеличение экспрессии Т-клеточного рецептора (TCR) альфа. В некоторых вариантах осуществления наблюдается увеличение экспрессии Т-клеточного

рецептора (TCR) бета. В некоторых вариантах осуществления наблюдается увеличение экспрессии TCRab (т. е. TCRα/β).

[00771] В некоторых вариантах осуществления культуральная среда для быстрой второй экспансии (например, иногда называемая CM2 или второй средой для культивирования клеток) содержит IL-2, OKT-3, а также антигенпрезентирующие фидерные клетки (АПК), как более подробно обсуждается ниже. В некоторых вариантах осуществления культуральная среда для быстрой второй экспансии (например, иногда называемая CM2 или второй средой для культивирования клеток) содержит 6000 МЕ/мл IL-2, 30 мкг/колбу OKT-3, а также 7,5 × 10^8 антигенпрезентирующих фидерных клеток (АПК), как более подробно обсуждается ниже. В некоторых вариантах осуществления культуральная среда для быстрой второй экспансии (например, иногда называемая CM2 или второй средой для культивирования клеток) содержит IL-2, OKT-3, а также антигенпрезентирующие фидерные клетки (АПК), как более подробно обсуждается ниже. В некоторых вариантах осуществления культуральная среда для быстрой второй экспансии (например, иногда называемая CM2 или второй средой для культивирования клеток) содержит 6000 МЕ/мл IL-2, 30 мкг/колбу OKT-3, а также 5 × 10^8 антигенпрезентирующих фидерных клеток (АПК), как более подробно обсуждается ниже.

[00772] В некоторых вариантах осуществления быструю фторую экспансию, например, этап D согласно фиг. 1 (в частности, например, фиг. 1B и/или фиг. 1C), проводят в биореакторе с закрытой системой. В некоторых вариантах осуществления для экспансии TIL используют закрытую систему, как описано в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления используют биореактор. В некоторых вариантах осуществления биореактор используют в качестве контейнера. В некоторых вариантах осуществления используемый биореактор представляет собой, например, G-REX-100 или G-REX-500. В некоторых вариантах осуществления используемый биореактор представляет собой G-REX-100. В некоторых вариантах осуществления используемый биореактор представляет собой G-REX-500.

1. Фидерные клетки и антигенпрезентирующие клетки

[00773] В одном из вариантов осуществления описанные в настоящем документе процедуры быстрой второй экспансии (например, включая экспансию, описанную на этапе D на фиг. 1 (в частности, например, фиг. 1B и/или фиг. 1C), а также экспансии, называемые REP) требуют избытка фидерных клеток во время экспансии REP TIL и/или во время быстрой второй экспансии. Во многих вариантах осуществления фидерные клетки представляют собой мононуклеарные клетки периферической крови (МНПК), полученные из стандартных единиц цельной крови от здоровых доноров крови. МНПК получают с использованием стандартных методов, таких как разделение в градиенте Ficoll-Paque.

[00774] Как правило, аллогенные МНПК подвергают инактивации, либо посредством облучения, либо посредством тепловой обработки, и используют в процедурах REP, как описано в разделе примеров, где представлен иллюстративный протокол для оценки неспособности к репликации облученных аллогенных МНПК.

[00775] В некоторых вариантах осуществления изобретения МНПК считаются неспособными к репликации и приемлемыми для применения в процедурах экспансии TIL, описанных в настоящем документе, если общее количество жизнеспособных клеток на день 7 или 14 меньше исходного количества жизнеспособных клеток, помещенных в культуру в день 0 REP и/или день 0 второй экспансии (т. е. день начала второй экспансии).

[00776] В некоторых вариантах осуществления изобретения МНПК считаются неспособными к репликации и приемлемыми для применения в процедурах экспансии TIL, описанных в настоящем документе, если общее количество жизнеспособных клеток, культивируемых в присутствии OKT3 и IL-2, на день 7 и день 14 не увеличилось по сравнению с первоначальным количеством жизнеспособных клеток, помещенных в культуру в день 0 REP и/или день 0 второй экспансии (т. е. день начала второй экспансии). В некоторых вариантах осуществления МНПК культивируют в присутствии 30 нг/мл антитела OKT3 и 3000 МЕ/мл IL-2. В некоторых вариантах осуществления МНПК культивируют в присутствии 60 нг/мл антитела OKT3 и 6000 МЕ/мл IL-2. В некоторых вариантах осуществления МНПК культивируют в присутствии 60 нг/мл антитела OKT3 и 3000 МЕ/мл IL-2. В некоторых вариантах осуществления МНПК культивируют в присутствии 30 нг/мл антитела OKT3 и 6000 МЕ/мл IL-2.

[00777] В некоторых вариантах осуществления изобретения МНПК считаются неспособными к репликации и приемлемыми для применения в процедурах экспансии TIL, описанных в настоящем документе, если общее количество жизнеспособных клеток, культивируемых в присутствии OKT3 и IL-2, на день 7 и день 14 не увеличилось по сравнению с первоначальным количеством жизнеспособных клеток, помещенных в культуру в день 0 REP и/или день 0 второй экспансии (т. е. день начала второй экспансии). В некоторых вариантах осуществления МНПК культивируют в присутствии 30-60 нг/мл антитела OKT3 и 1000-6000 МЕ/мл IL-2. В некоторых вариантах осуществления МНПК культивируют в присутствии 30-60 нг/мл антитела OKT3 и 2000-5000 МЕ/мл IL-2. В некоторых вариантах осуществления МНПК культивируют в присутствии 30-60 нг/мл антитела OKT3 и 2000-4000 МЕ/мл IL-2. В некоторых вариантах осуществления МНПК культивируют в присутствии 30-60 нг/мл антитела OKT3 и 2500-3500 МЕ/мл IL-2. В некоторых вариантах осуществления МНПК культивируют в присутствии 30-60 нг/мл антитела OKT3 и 6000 МЕ/мл IL-2.

[00778] В некоторых вариантах осуществления антигенпрезентирующие фидерные клетки представляют собой МНПК. В некоторых вариантах осуществления антигенпрезентирующие фидерные клетки представляют собой искусственные антигенпрезентирующие фидерные клетки. В одном из вариантов осуществления соотношение TIL и антигенпрезентирующих фидерных клеток при второй экспансии 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. В одном из вариантов осуществления соотношение TIL и антигенпрезентирующих фидерных клеток при второй экспансии составляет от 1 к 50 до 1 к 300. В одном из вариантов осуществления соотношение TIL и антигенпрезентирующих фидерных клеток при второй экспансии составляет от 1 к 100 до 1 к 200.

[00779] В одном из вариантов осуществления для описанных в настоящем документе процедур второй экспансии требуется соотношение приблизительно 5×10^8 фидерных клеток на приблизительно 100×10^6 TIL. В одном из вариантов осуществления для описанных в настоящем документе процедур второй экспансии требуется соотношение приблизительно $7,5 \times 10^8$ фидерных клеток на приблизительно 100×10^6 TIL. В еще одном варианте осуществления для описанных в настоящем документе процедур второй экспансии требуется соотношение приблизительно 5×10^8 фидерных клеток на приблизительно 50×10^6 TIL. В еще одном варианте осуществления для описанных в настоящем документе процедур второй экспансии требуется соотношение приблизительно $7,5 \times 10^8$ фидерных клеток на приблизительно 50×10^6 TIL. В еще одном варианте осуществления для описанных в настоящем документе процедур второй экспансии требуется приблизительно 5×10^8 фидерных клеток на приблизительно 25×10^6 TIL. В еще одном варианте осуществления для описанных в настоящем документе процедур второй экспансии требуется приблизительно $7,5 \times 10^8$ фидерных клеток на приблизительно 25×10^6 TIL. В еще одном варианте осуществления для быстрой второй экспансии требуется в два раза большее количество фидерных клеток по сравнению с быстрой второй экспансией. В еще одном варианте осуществления когда для описанной в настоящем документе примирующей первой экспансии требуется приблизительно $2,5 \times 10^8$ фидерных клеток, для быстрой второй экспансии требуется приблизительно 5×10^8 фидерных клеток. В еще одном варианте осуществления когда для описанной в настоящем документе примирующей первой экспансии требуется приблизительно $2,5 \times 10^8$ фидерных клеток, для быстрой второй экспансии требуется приблизительно $7,5 \times 10^8$ фидерных клеток. В еще одном варианте осуществления для быстрой второй экспансии требуется в два раза (2,0X), 2,5X, 3,0X, 3,5X или 4,0X большее количество фидерных клеток по сравнению с примирующей первой экспансией.

[00780] В некоторых вариантах осуществления для описанных в настоящем документе процедур второй экспансии требуется соотношение приблизительно 5×10^8 фидерных клеток на приблизительно 100×10^6 TIL. В одном из вариантов осуществления для описанных в настоящем документе процедур второй экспансии требуется соотношение приблизительно $7,5 \times 10^8$ фидерных клеток на приблизительно 100×10^6 TIL. В еще одном варианте осуществления для описанных в настоящем документе процедур второй экспансии требуется соотношение приблизительно 5×10^8 фидерных клеток на приблизительно 50×10^6 TIL. В еще одном варианте осуществления для описанных в настоящем документе процедур второй экспансии требуется соотношение приблизительно $7,5 \times 10^8$ фидерных клеток на приблизительно 50×10^6 TIL. В еще одном варианте

осуществления для описанных в настоящем документе процедур второй экспансии требуется приблизительно 5×10^8 фидерных клеток на приблизительно 25×10^6 TIL. В еще одном варианте осуществления для описанных в настоящем документе процедур второй экспансии требуется приблизительно $7,5 \times 10^8$ фидерных клеток на приблизительно 25×10^6 TIL. В еще одном варианте осуществления для быстрой второй экспансии требуется такое же количество фидерных клеток, как и для быстрой второй экспансии. В еще одном варианте осуществления когда для описанной в настоящем документе примирующей первой экспансии требуется приблизительно $2,5 \times 10^8$ фидерных клеток, для быстрой второй экспансии требуется приблизительно $2,5 \times 10^8$ фидерных клеток. В еще одном варианте осуществления когда для описанной в настоящем документе примирующей первой экспансии требуется приблизительно 5×10^8 фидерных клеток, для быстрой второй экспансии требуется приблизительно 5×10^8 фидерных клеток. В еще одном варианте осуществления когда для описанной в настоящем документе примирующей первой экспансии требуется приблизительно $7,5 \times 10^8$ фидерных клеток, для быстрой второй экспансии требуется приблизительно $7,5 \times 10^8$ фидерных клеток. В еще одном варианте осуществления для быстрой второй экспансии требуется в два раза (2,0X), 2,5X, 3,0X, 3,5X или 4,0X большее количество фидерных клеток по сравнению с примирующей первой экспансией.

[00781] В некоторых вариантах осуществления для описанных в настоящем документе процедур второй экспансии требуется соотношение приблизительно 5×10^8 фидерных клеток на приблизительно 100×10^6 TIL. В одном из вариантов осуществления для описанных в настоящем документе процедур второй экспансии требуется соотношение приблизительно $7,5 \times 10^8$ фидерных клеток на приблизительно 100×10^6 TIL. В еще одном варианте осуществления для описанных в настоящем документе процедур второй экспансии требуется соотношение приблизительно 5×10^8 фидерных клеток на приблизительно 50×10^6 TIL. В еще одном варианте осуществления для описанных в настоящем документе процедур второй экспансии требуется соотношение приблизительно $7,5 \times 10^8$ фидерных клеток на приблизительно 50×10^6 TIL. В еще одном варианте осуществления для описанных в настоящем документе процедур второй экспансии требуется приблизительно 5×10^8 фидерных клеток на приблизительно 25×10^6 TIL. В еще одном варианте осуществления для описанных в настоящем документе процедур второй экспансии требуется приблизительно $7,5 \times 10^8$ фидерных клеток на приблизительно 25×10^6 TIL. В еще одном варианте осуществления для быстрой второй экспансии требуется такое же количество фидерных клеток, как и для быстрой второй экспансии. В еще одном варианте осуществления когда для описанной в настоящем документе примирующей первой экспансии требуется приблизительно $2,5 \times 10^8$ фидерных клеток, для быстрой второй экспансии требуется приблизительно $2,5 \times 10^8$ фидерных клеток. В еще одном варианте осуществления, когда для описанной в настоящем документе примирующей первой экспансии требуется приблизительно 5×10^8 фидерных клеток, для быстрой второй экспансии требуется приблизительно 5×10^8 фидерных клеток. В еще одном варианте

осуществления, когда для описанной в настоящем документе примирующей первой экспансии требуется приблизительно 7,5 × 10^8 фидерных клеток, для быстрой второй экспансии требуется приблизительно 7,5 × 10^8 фидерных клеток.

[00782] В одном из вариантов осуществления описанные в настоящем документе процедуры быстрой второй экспансии требуют избытка фидерных клеток во время быстрой второй экспансии. Во многих вариантах осуществления фидерные клетки представляют собой мононуклеарные клетки периферической крови (МНПК), полученные из стандартных единиц цельной крови от аллогенных здоровых доноров крови. МНПК получают с использованием стандартных методов, таких как разделение в градиенте Ficoll-Paque. В одном из вариантов осуществления вместо МНПК используют искусственные антигенпрезентирующие клетки (иАПК). В некоторых вариантах осуществления при быстрой второй экспансии МНПК добавляют во в два раза большей концентрации МНПК, чем добавленная при примирующей первой экспансии.

[00783] Как правило, аллогенные МНПК подвергают инактивации, либо посредством облучения, либо посредством тепловой обработки, и используют в процедурах экспансии TIL, описанных в настоящем документе, включая иллюстративные процедуры, описанные на фигурах и в разделе примеров.

[00784] В одном из вариантов осуществления искусственные антигенпрезентирующие клетки используют в быстрой второй экспансии в качестве замены МНПК или в комбинации с ними.

[00785] Может быть введена любая подходящая доза TIL. В некоторых вариантах осуществления вводят от приблизительно 2,3×10^{10} до приблизительно 13,7×10^{10} TIL, в среднем около 7,8×10^{10} TIL, в частности, если рак представляет собой меланому. В одном из вариантов осуществления вводят от приблизительно 1,2×10^{10} до приблизительно 4,3×10^{10} TIL. В некоторых вариантах осуществления вводят от приблизительно 3×10^{10} до приблизительно 12×10^{10} TIL. В некоторых вариантах осуществления вводят от приблизительно 4×10^{10} до приблизительно 10×10^{10} TIL. В некоторых вариантах осуществления вводят от приблизительно 5×10^{10} до приблизительно 8×10^{10} TIL. В некоторых вариантах осуществления вводят от приблизительно 6×10^{10} до приблизительно 8×10^{10} TIL. В некоторых вариантах осуществления вводят от приблизительно 7×10^{10} до приблизительно 8×10^{10} TIL. В некоторых вариантах осуществления терапевтически эффективная дозировка составляет от приблизительно 2,3×10^{10} до приблизительно 13,7×10^{10}. В некоторых вариантах осуществления терапевтически эффективная дозировка составляет приблизительно 7,8×10^{10}, в частности, если рак представляет собой меланому. В некоторых вариантах осуществления терапевтически эффективная дозировка составляет от приблизительно 1,2×10^{10} до приблизительно 4,3×10^{10} TIL. В некоторых вариантах осуществления терапевтически эффективная дозировка составляет от приблизительно 3×10^{10} до приблизительно 12×10^{10} TIL. В некоторых вариантах осуществления терапевтически эффективная дозировка составляет от приблизительно 4×10^{10} до приблизительно 10×10^{10} TIL. В некоторых вариантах осуществления терапевтически

эффективная дозировка составляет от приблизительно 5×10^{10} до приблизительно 8×10^{10} TIL. В некоторых вариантах осуществления терапевтически эффективная дозировка составляет от приблизительно 6×10^{10} до приблизительно 8×10^{10} TIL. В некоторых вариантах осуществления терапевтически эффективная дозировка составляет от приблизительно 7×10^{10} до приблизительно 8×10^{10} TIL.

[00786] В некоторых вариантах осуществления количество TIL, содержащееся в фармацевтических композициях согласно изобретению, составляет приблизительно 1×10^{6}, 2×10^{6}, 3×10^{6}, 4×10^{6}, 5×10^{6}, 6×10^{6}, 7×10^{6}, 8×10^{6}, 9×10^{6}, 1×10^{7}, 2×10^{7}, 3×10^{7}, 4×10^{7}, 5×10^{7}, 6×10^{7}, 7×10^{7}, 8×10^{7}, 9×10^{7}, 1×10^{8}, 2×10^{8}, 3×10^{8}, 4×10^{8}, 5×10^{8}, 6×10^{8}, 7×10^{8}, 8×10^{8}, 9×10^{8}, 1×10^{9}, 2×10^{9}, 3×10^{9}, 4×10^{9}, 5×10^{9}, 6×10^{9}, 7×10^{9}, 8×10^{9}, 9×10^{9}, 1×10^{10}, 2×10^{10}, 3×10^{10}, 4×10^{10}, 5×10^{10}, 6×10^{10}, 7×10^{10}, 8×10^{10}, 9×10^{10}, 1×10^{11}, 2×10^{11}, 3×10^{11}, 4×10^{11}, 5×10^{11}, 6×10^{11}, 7×10^{11}, 8×10^{11}, 9×10^{11}, 1×10^{12}, 2×10^{12}, 3×10^{12}, 4×10^{12}, 5×10^{12}, 6×10^{12}, 7×10^{12}, 8×10^{12}, 9×10^{12}, 1×10^{13}, 2×10^{13}, 3×10^{13}, 4×10^{13}, 5×10^{13}, 6×10^{13}, 7×10^{13}, 8×10^{13} и 9×10^{13}. В одном из вариантов осуществления количество TIL, содержащееся в фармацевтических композициях согласно 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}.

[00787]

2. Цитокины

[00788] В описанных в настоящем документе способах быстрой второй экспансии обычно используют культуральные среды с высокими дозами цитокина, в частности, IL-2, как это известно в данной области техники.

[00789] В качестве альтернативы, также возможно использование комбинаций цитокинов для быстрой второй экспансии TIL, с комбинациями двух или более из IL-2, IL-15 и IL-21, как в целом описано в публикации международной заявки WO 2015/189356 и WO 2015/189357, в явном виде включенных в настоящий документ посредством ссылки в полном объеме. Таким образом, возможные комбинации включают IL-2 и IL-15, IL-2 и IL-21, IL-15 и IL-21 и IL-2, IL-15 и IL-21, причем последняя является особенно подходящей для многих вариантов осуществления. Использование комбинаций цитокинов, в частности, способствует образованию лимфоцитов и, в частности, Т-клеток, как описано в настоящем документе.

ЭТАП Е. Сбор TIL

[00790] После этапа быстрой второй экспансии клетки могут быть собраны. В некоторых вариантах осуществления TIL собирают после одного, двух, трех, четырех или более этапов экспансии, например, как показано на фиг. 1 (в частности, например, фиг. 1B и/или фиг. 1C). В некоторых вариантах осуществления TIL собирают после двух этапов экспансии, например, как показано на фиг. 1 (в частности, например, фиг. 1B и/или фиг. 1C). В некоторых вариантах осуществления TIL собирают после двух этапов экспансии - одной примирующей первой экспансии и одной быстрой второй экспансии - например, как

показано на фиг. 1 (в частности, например, фиг. 1B).

[00791] TIL могут быть собраны любым подходящим и стерильным способом, включая, например, центрифугирование. Способы сбора TIL хорошо известны в данной области техники, и в настоящем процессе могут быть применены любые такие известные способы. В некоторых вариантах осуществления TIL собирают с использованием автоматизированной системы.

[00792] Сборщики 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 настоящих способах может быть использован любой сборщик клеток. В некоторых вариантах осуществления сборщик клеток и/или система обработки клеток представляют собой мембранный сборщик клеток. В некоторых вариантах осуществления сбор клеток осуществляется с помощью системы обработки клеток, такой как система LOVO (производимая Fresenius Kabi). Термин «система обработки клеток LOVO» также относится к любому инструменту или устройству, производимому любым поставщиком, которое может перекачивать раствор, содержащий клетки, через мембрану или фильтр, такой как вращающаяся мембрана или вращающийся фильтр, в среде в стерильной и/или закрытой системе, обеспечивая непрерывный поток и обработку клеток для удаления супернатанта или сред для культивирования клеток без образования осадка. В некоторых вариантах осуществления сборщик клеток и/или система обработки клеток могут осуществлять операции разделения клеток, промывки, замены жидкости, концентрирования и/или другие этапы обработки клеток в закрытой стерильной системе.

[00793] В некоторых вариантах осуществления быструю фторую экспансию, например, этап D согласно фиг. 1 (в частности, например, фиг. 1B и/или фиг. 1C), проводят в биореакторе с закрытой системой. В некоторых вариантах осуществления для экспансии TIL используют закрытую систему, как описано в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления используют биореактор. В некоторых вариантах осуществления биореактор используют в качестве контейнера. В некоторых вариантах осуществления используемый биореактор представляет собой, например, G-REX-100 или G-REX-500. В некоторых вариантах осуществления используемый биореактор представляет собой G-REX-100. В некоторых вариантах осуществления используемый биореактор представляет собой G-REX-500.

[00794] В некоторых вариантах осуществления этап E согласно фиг. 1 (в частности, например, фиг. 1B и/или фиг. 1C) проводят в соответствии с процессами, описанными в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления доступ к закрытой системе осуществляется через шприцы в стерильных условиях, чтобы не нарушать стерильность и закрытый характер системы. В некоторых вариантах осуществления используют закрытую систему, как описано в настоящем документе.

[00795] В некоторых вариантах осуществления TIL собирают в соответствии со способами, описанными в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления

TIL между днями 14 и 16 собирают с использованием способов, описанных в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления TIL собирают через 14 дней с использованием способов, описанных в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления TIL собирают через 15 дней с использованием способов, описанных в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления TIL собирают через 16 дней с использованием способов, описанных в настоящем документе.

ЭТАП F. Приготовление готового препарата/перенос в пакет для инфузии

[00796] После завершения этапов с A по E, как показано в иллюстративном порядке на фиг. 1 (в частности, например, фиг. 1B и/или фиг. 1C) и как подробно описано выше и в настоящем документе, клетки переносят в контейнер для применения для введения пациенту. В некоторых вариантах осуществления после получения терапевтически достаточного количества TIL с использованием описанных выше способов экспансии TIL переносят в контейнер для применения для введения пациенту.

[00797] В одном из вариантов осуществления TIL, подвергнутые экспансии с использованием способов согласно настоящему изобретению, вводят пациенту в виде фармацевтической композиции. В одном из вариантов осуществления фармацевтическая композиция представляет собой суспензию TIL в стерильном буфере. TIL, подвергнутые экспансии, как раскрыто в настоящем документе, могут быть введены любым подходящим способом, известным в данной области техники. В некоторых вариантах осуществления TIL вводят в виде однократной внутриартериальной или внутривенной инфузии, которая предпочтительно длится примерно от 30 до 60 минут. Другие подходящие способы введения включают внутрибрюшинный, интратекальный и внутрилимфатический.

Соотношения фидерных клеток МНПК

[00798] В некоторых вариантах осуществления культуральные среды, используемые в способах экспансии, описанных в настоящем документе (см., например, фиг. 1 (в частности, например, фиг. 1B и/или фиг. 1C)), включают антитело к CD3, например, OKT-3. Антитело к CD3 в комбинации с IL-2 индуцирует активацию Т-клеток и деление клеток в популяции TIL. Этот эффект может наблюдаться с полноразмерными антителами, а также с фрагментами Fab и F(ab')2, причем первые обычно являются предпочтительными; см., например, источник Tsoukas *et al.*, *J. Immunol.* 1985, *135,* 1719, настоящим включенный посредством ссылки в полном объеме.

[00799] В одном из вариантов осуществления количество слоев фидерных МНПК рассчитывают следующим образом:

A. Объем Т-клетки (диаметром 10 мкм): $V = (4/3)\,\pi r^3 = 523{,}6$ мкм^3

B. Колонка в G-Rex 100 (M) высотой 40 мкм (4 клетки): $V = (4/3)\,\pi r^3 = 4\times10^{12}$ мкм^3

C. Количество клеток, необходимое для заполнения колонки B: 4×10^{12} мкм^3/523,6 мкм^3=$7{,}6\times10^8$ мкм^3 * 0,64=$4{,}86\times10^8$

D. Количество клеток, которые могут быть оптимально активированы в четырехмерном пространстве: $4{,}86\times10^8/24=20{,}25\times10^6$E. Количество фидеров и TIL, экстраполированное на G-Rex 500: TIL: 100×10^6 и фидер: $2{,}5\times10^9$

[00800] В этом расчете используется приближение количества мононуклеарных клеток, необходимого для обеспечения геометрии икосаэдра для активации TIL в цилиндре с площадью основания 100 $см^2$. Расчет дает экспериментальный результат $\sim 5 \times 10^8$ для пороговой активации Т-клеток, что близко отражает экспериментальные данные NCI.[(1)] (C) Множитель (0,64) - это плотность случайной упаковки для эквивалентных сфер, рассчитанная Jaeger и Nagel в 1992 [(2)]. (D) Делитель 24 - это количество эквивалентных сфер, которые могут контактировать с аналогичным объектом в четырехмерном пространстве «число Ньютона».[(3)].

[00801] [(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.

[00802] [(2)] Jaeger HM, Nagel SR. Physics of the granular state. Science. 1992 Mar 20;255(5051):1523-31.

[00803] [(3)] O. R. Musin (2003). "The problem of the twenty-five spheres". Russ. Math. Surv. 58 (4): 794-795.

[00804] В одном из вариантов осуществления количество антигенпрезентирующих фидерных клеток, экзогенно вводимых во время примирующей первой экспансии, составляет приблизительно половину от количества антигенпрезентирующих фидерных клеток, экзогенно вводимых во время быстрой второй экспансии. В отдельных вариантах осуществления способ включает проведение примирующей первой экспансии в среде для культивирования клеток, которая содержит приблизительно на 50% меньше антигенпрезентирующих клеток по сравнению со средой для культивирования клеток для быстрой второй экспансии.

[00805] В еще одном варианте осуществления количество антигенпрезентирующих фидерных клеток (АПК), экзогенно вводимых во время быстрой второй экспансии, больше, чем количество АПК, экзогенно вводимых во время примирующей первой экспансии.

[00806] В еще одном варианте осуществления соотношение количества АПК, экзогенно вводимых во время быстрой второй экспансии, и количества АПК, экзогенно вводимых во время примирующей первой экспансии, выбрано из диапазона от или приблизительно от 1,1:1 до или приблизительно до 20:1.

[00807] В еще одном варианте осуществления соотношение количества АПК, экзогенно вводимых во время быстрой второй экспансии, и количества АПК, экзогенно вводимых во время примирующей первой экспансии, выбрано из диапазона от или приблизительно от 1,1:1 до или приблизительно до 10:1.

[00808] В еще одном варианте осуществления соотношение количества АПК, экзогенно вводимых во время быстрой второй экспансии, и количества АПК, экзогенно вводимых во время примирующей первой экспансии, выбрано из диапазона от или приблизительно от 1,1:1 до или приблизительно до 9:1.

[00809] В еще одном варианте осуществления соотношение количества АПК, экзогенно вводимых во время быстрой второй экспансии, и количества АПК, экзогенно

вводимых во время примирующей первой экспансии, выбрано из диапазона от или приблизительно от 1,1:1 до или приблизительно до 8:1.

[00810] В еще одном варианте осуществления соотношение количества АПК, экзогенно вводимых во время быстрой второй экспансии, и количества АПК, экзогенно вводимых во время примирующей первой экспансии, выбрано из диапазона от или приблизительно от 1,1:1 до или приблизительно до 7:1.

[00811] В еще одном варианте осуществления соотношение количества АПК, экзогенно вводимых во время быстрой второй экспансии, и количества АПК, экзогенно вводимых во время примирующей первой экспансии, выбрано из диапазона от или приблизительно от 1,1:1 до или приблизительно до 6:1.

[00812] В еще одном варианте осуществления соотношение количества АПК, экзогенно вводимых во время быстрой второй экспансии, и количества АПК, экзогенно вводимых во время примирующей первой экспансии, выбрано из диапазона от или приблизительно от 1,1:1 до или приблизительно до 5:1.

[00813] В еще одном варианте осуществления соотношение количества АПК, экзогенно вводимых во время быстрой второй экспансии, и количества АПК, экзогенно вводимых во время примирующей первой экспансии, выбрано из диапазона от или приблизительно от 1,1:1 до или приблизительно до 4:1.

[00814] В еще одном варианте осуществления соотношение количества АПК, экзогенно вводимых во время быстрой второй экспансии, и количества АПК, экзогенно вводимых во время примирующей первой экспансии, выбрано из диапазона от или приблизительно от 1,1:1 до или приблизительно до 3:1.

[00815] В еще одном варианте осуществления соотношение количества АПК, экзогенно вводимых во время быстрой второй экспансии, и количества АПК, экзогенно вводимых во время примирующей первой экспансии, выбрано из диапазона от или приблизительно от 1,1:1 до или приблизительно до 2,9:1.

[00816] В еще одном варианте осуществления соотношение количества АПК, экзогенно вводимых во время быстрой второй экспансии, и количества АПК, экзогенно вводимых во время примирующей первой экспансии, выбрано из диапазона от или приблизительно от 1,1:1 до или приблизительно до 2,8:1.

[00817] В еще одном варианте осуществления соотношение количества АПК, экзогенно вводимых во время быстрой второй экспансии, и количества АПК, экзогенно вводимых во время примирующей первой экспансии, выбрано из диапазона от или приблизительно от 1,1:1 до или приблизительно до 2,7:1.

[00818] В еще одном варианте осуществления соотношение количества АПК, экзогенно вводимых во время быстрой второй экспансии, и количества АПК, экзогенно вводимых во время примирующей первой экспансии, выбрано из диапазона от или приблизительно от 1,1:1 до или приблизительно до 2,6:1.

[00819] В еще одном варианте осуществления соотношение количества АПК, экзогенно вводимых во время быстрой второй экспансии, и количества АПК, экзогенно

вводимых во время примирующей первой экспансии, выбрано из диапазона от или приблизительно от 1,1:1 до или приблизительно до 2,5:1.

[00820] В еще одном варианте осуществления соотношение количества АПК, экзогенно вводимых во время быстрой второй экспансии, и количества АПК, экзогенно вводимых во время примирующей первой экспансии, выбрано из диапазона от или приблизительно от 1,1:1 до или приблизительно до 2,4:1.

[00821] В еще одном варианте осуществления соотношение количества АПК, экзогенно вводимых во время быстрой второй экспансии, и количества АПК, экзогенно вводимых во время примирующей первой экспансии, выбрано из диапазона от или приблизительно от 1,1:1 до или приблизительно до 2,3:1.

[00822] В еще одном варианте осуществления соотношение количества АПК, экзогенно вводимых во время быстрой второй экспансии, и количества АПК, экзогенно вводимых во время примирующей первой экспансии, выбрано из диапазона от или приблизительно от 1,1:1 до или приблизительно до 2,2:1.

[00823] В еще одном варианте осуществления соотношение количества АПК, экзогенно вводимых во время быстрой второй экспансии, и количества АПК, экзогенно вводимых во время примирующей первой экспансии, выбрано из диапазона от или приблизительно от 1,1:1 до или приблизительно до 2,1:1.

[00824] В еще одном варианте осуществления соотношение количества АПК, экзогенно вводимых во время быстрой второй экспансии, и количества АПК, экзогенно вводимых во время примирующей первой экспансии, выбрано из диапазона от или приблизительно от 1,1:1 до или приблизительно до 2:1.

[00825] В еще одном варианте осуществления соотношение количества АПК, экзогенно вводимых во время быстрой второй экспансии, и количества АПК, экзогенно вводимых во время примирующей первой экспансии, выбрано из диапазона от или приблизительно от 2:1 до или приблизительно до 10:1.

[00826] В еще одном варианте осуществления соотношение количества АПК, экзогенно вводимых во время быстрой второй экспансии, и количества АПК, экзогенно вводимых во время примирующей первой экспансии, выбрано из диапазона от или приблизительно от 2:1 до или приблизительно до 5:1.

[00827] В еще одном варианте осуществления соотношение количества АПК, экзогенно вводимых во время быстрой второй экспансии, и количества АПК, экзогенно вводимых во время примирующей первой экспансии, выбрано из диапазона от или приблизительно от 2:1 до или приблизительно до 4:1.

[00828] В еще одном варианте осуществления соотношение количества АПК, экзогенно вводимых во время быстрой второй экспансии, и количества АПК, экзогенно вводимых во время примирующей первой экспансии, выбрано из диапазона от или приблизительно от 2:1 до или приблизительно до 3:1.

[00829] В еще одном варианте осуществления соотношение количества АПК, экзогенно вводимых во время быстрой второй экспансии, и количества АПК, экзогенно

вводимых во время примирующей первой экспансии, выбрано из диапазона от или приблизительно от 2:1 до или приблизительно до 2,9:1.

[00830] В еще одном варианте осуществления соотношение количества АПК, экзогенно вводимых во время быстрой второй экспансии, и количества АПК, экзогенно вводимых во время примирующей первой экспансии, выбрано из диапазона от или приблизительно от 2:1 до или приблизительно до 2,8:1.

[00831] В еще одном варианте осуществления соотношение количества АПК, экзогенно вводимых во время быстрой второй экспансии, и количества АПК, экзогенно вводимых во время примирующей первой экспансии, выбрано из диапазона от или приблизительно от 2:1 до или приблизительно до 2,7:1.

[00832] В еще одном варианте осуществления соотношение количества АПК, экзогенно вводимых во время быстрой второй экспансии, и количества АПК, экзогенно вводимых во время примирующей первой экспансии, выбрано из диапазона от или приблизительно от 2:1 до или приблизительно до 2,6:1.

[00833] В еще одном варианте осуществления соотношение количества АПК, экзогенно вводимых во время быстрой второй экспансии, и количества АПК, экзогенно вводимых во время примирующей первой экспансии, выбрано из диапазона от или приблизительно от 2:1 до или приблизительно до 2,5:1.

[00834] В еще одном варианте осуществления соотношение количества АПК, экзогенно вводимых во время быстрой второй экспансии, и количества АПК, экзогенно вводимых во время примирующей первой экспансии, выбрано из диапазона от или приблизительно от 2:1 до или приблизительно до 2,4:1.

[00835] В еще одном варианте осуществления соотношение количества АПК, экзогенно вводимых во время быстрой второй экспансии, и количества АПК, экзогенно вводимых во время примирующей первой экспансии, выбрано из диапазона от или приблизительно от 2:1 до или приблизительно до 2,3:1.

[00836] В еще одном варианте осуществления соотношение количества АПК, экзогенно вводимых во время быстрой второй экспансии, и количества АПК, экзогенно вводимых во время примирующей первой экспансии, выбрано из диапазона от или приблизительно от 2:1 до или приблизительно до 2,2:1.

[00837] В еще одном варианте осуществления соотношение количества АПК, экзогенно вводимых во время быстрой второй экспансии, и количества АПК, экзогенно вводимых во время примирующей первой экспансии, выбрано из диапазона от или приблизительно от 2:1 до или приблизительно до 2,1:1.

[00838] В еще одном варианте осуществления соотношение количества АПК, экзогенно вводимых во время быстрой второй экспансии, и количества АПК, экзогенно вводимых во время примирующей первой экспансии, составляет или приблизительно составляет 2:1.

[00839] В еще одном варианте осуществления соотношение количества АПК, экзогенно вводимых во время быстрой второй экспансии, и количества АПК, экзогенно

вводимых во время примирующей первой экспансии, составляет или приблизительно составляет 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.

[00840] В еще одном варианте осуществления количество АПК, экзогенно вводимых во время примирующей первой экспансии, составляет или приблизительно составляет 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 количество АПК, экзогенно вводимых во время быстрой второй экспансии, составляет или приблизительно составляет $3,5\times10^8$, $3,6\times10^8$, $3,7\times10^8$, $3,8\times10^8$, $3,9\times10^8$, 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.

[00841] В еще одном варианте осуществления количество АПК, экзогенно вводимых во время примирующей первой экспансии, выбрано из диапазона от или приблизительно от $1,5\times10^8$ АПК до или приблизительно до 3×10^8 АПК, и количество АПК, экзогенно вводимых во время быстрой второй экспансии, выбрано из диапазона от или приблизительно от 4×10^8 АПК до или приблизительно до $7,5\times10^8$ АПК.

[00842] В еще одном варианте осуществления количество АПК, экзогенно вводимых во время примирующей первой экспансии, выбрано из диапазона от или приблизительно от 2×10^8 АПК до или приблизительно до $2,5\times10^8$ АПК, и количество АПК, экзогенно вводимых во время быстрой второй экспансии, выбрано из диапазона от или приблизительно от $4,5\times10^8$ АПК до или приблизительно до $5,5\times10^8$ АПК.

[00843] В еще одном варианте осуществления количество АПК, экзогенно вводимых во время примирующей первой экспансии, составляет или приблизительно составляет $2,5\times10^8$ АПК, и количество АПК, экзогенно вводимых во время быстрой второй экспансии, составляет или приблизительно составляет 5×10^8 АПК.

[00844] В одном из вариантов осуществления количество АПК (включая, например, МНПК), добавляемых в день 0 примирующей первой экспансии, составляет приблизительно половину от количества МНПК, добавляемых на день 7 примирующей первой экспансии (например, день 7 способа). В отдельных вариантах осуществления способ включает добавление антигенпрезентирующих клеток в день 0 примирующей первой экспансии к первой популяции TIL, и добавление антигенпрезентирующих клеток на день 7 ко второй популяции TIL, где количество антигенпрезентирующих клеток, добавляемых в день 0, составляет приблизительно 50% от количества антигенпрезентирующих клеток, добавляемых на день 7 примирующей первой экспансии (например, день 7 способа).

[00845] В еще одном варианте осуществления количество АПК (включая, например, МНПК), экзогенно вводимых на день 7 быстрой второй экспансии, больше, чем количество МНПК, экзогенно вводимых в день 0 примирующей первой экспансии.

[00846] В еще одном варианте осуществления АПК, экзогенно вводимые при примирующей первой экспансии, высевают в колбу для культивирования с плотностью, выбранной из диапазона от или приблизительно от $1,0\times10^6$ АПК/см^2 до или приблизительно до $4,5\times10^6$ АПК/см^2.

[00847] В еще одном варианте осуществления АПК, экзогенно вводимые при примирующей первой экспансии, высевают в колбу для культивирования с плотностью, выбранной из диапазона от или приблизительно от $1,5\times10^6$ АПК/см^2 до или приблизительно до $3,5\times10^6$ АПК/см^2.

[00848] В еще одном варианте осуществления АПК, экзогенно вводимые при примирующей первой экспансии, высевают в колбу для культивирования с плотностью, выбранной из диапазона от или приблизительно от 2×10^6 АПК/см^2 до или приблизительно до 3×10^6 АПК/см^2.

[00849] В еще одном варианте осуществления АПК, экзогенно вводимые при примирующей первой экспансии, высевают в колбу для культивирования с плотностью, составляющей или приблизительно составляющей 2×10^6 АПК/см^2.

[00850] В еще одном варианте осуществления АПК, экзогенно вводимые при примирующей первой экспансии, высевают в колбу для культивирования с плотностью, составляющей или приблизительно составляющей $1,0\times10^6$, $1,1\times10^6$, $1,2\times10^6$, $1,3\times10^6$, $1,4\times10^6$, $1,5\times10^6$, $1,6\times10^6$, $1,7\times10^6$, $1,8\times10^6$, $1,9\times10^6$, 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.

[00851] В еще одном варианте осуществления АПК, экзогенно вводимые при быстрой второй экспансии, высевают в колбу для культивирования с плотностью, выбранной из диапазона от или приблизительно от $2,5\times10^6$ АПК/см^2 до или приблизительно до $7,5\times10^6$ АПК/см^2.

[00852] В еще одном варианте осуществления АПК, экзогенно вводимые при быстрой второй экспансии, высевают в колбу для культивирования с плотностью, выбранной из диапазона от или приблизительно от $3,5\times10^6$ АПК/см^2 до или приблизительно до $6,0\times10^6$ АПК/см^2.

[00853] В еще одном варианте осуществления АПК, экзогенно вводимые при быстрой второй экспансии, высевают в колбу для культивирования с плотностью, выбранной из диапазона от или приблизительно от $4,0\times10^6$ АПК/см^2 до приблизительно $5,5\times10^6$ АПК/см^2.

[00854] В еще одном варианте осуществления АПК, экзогенно вводимые при быстрой второй экспансии, высевают в колбу для культивирования с плотностью, выбранной из диапазона, составляющего или приблизительно составляющего $4,0\times10^6$

АПК/см^2.

[00855] В еще одном варианте осуществления АПК, экзогенно вводимые при быстрой второй экспансии, высевают в колбу для культивирования с плотностью, составляющей или приблизительно составляющей $2,5\times10^6$ 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.

[00856] В еще одном варианте осуществления АПК, экзогенно вводимые при примирующей первой экспансии, высевают в колбу для культивирования с плотностью, составляющей или приблизительно составляющей $1,0\times10^6$, $1,1\times10^6$, $1,2\times10^6$, $1,3\times10^6$, $1,4\times10^6$, $1,5\times10^6$, $1,6\times10^6$, $1,7\times10^6$, $1,8\times10^6$, $1,9\times10^6$, 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, экзогенно вводимые при быстрой второй экспансии, высевают в колбу для культивирования с плотностью, составляющей или приблизительно составляющей $2,5\times10^6$ 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.

[00857] В еще одном варианте осуществления АПК, экзогенно вводимые при примирующей первой экспансии, высевают в колбу для культивирования с плотностью, выбранной из диапазона от или приблизительно от $1,0\times10^6$ АПК/см^2 до или приблизительно до $4,5\times10^6$ АПК/см^2, и АПК, экзогенно вводимые при быстрой второй экспансии, высевают в колбу для культивирования с плотностью, выбранной из диапазона от или приблизительно от $2,5\times10^6$ АПК/см^2 до или приблизительно до $7,5\times10^6$ АПК/см^2.

[00858] В еще одном варианте осуществления АПК, экзогенно вводимые при примирующей первой экспансии, высевают в колбу для культивирования с плотностью, выбранной из диапазона от или приблизительно от $1,5\times10^6$ АПК/см^2 до или приблизительно до $3,5\times10^6$ АПК/см^2, и АПК, экзогенно вводимые при быстрой второй экспансии, высевают в колбу для культивирования с плотностью, выбранной из диапазона от или приблизительно от $3,5\times10^6$ АПК/см^2 до или приблизительно до 6×10^6 АПК/см^2.

[00859] В еще одном варианте осуществления АПК, экзогенно вводимые при примирующей первой экспансии, высевают в колбу для культивирования с плотностью, выбранной из диапазона от или приблизительно от 2×10^6 АПК/см^2 до или приблизительно до 3×10^6 АПК/см^2, и АПК, экзогенно вводимые при быстрой второй экспансии, высевают в колбу для культивирования с плотностью, выбранной из диапазона от или приблизительно

от 4×10^6 АПК/см^2 до или приблизительно до $5,5\times10^6$ АПК/см^2.

[00860] В еще одном варианте осуществления АПК, экзогенно вводимые при примирующей первой экспансии, высевают в колбу для культивирования с плотностью, составляющей или приблизительно составляющей 2×10^6 АПК/см^2, и АПК, экзогенно вводимые при быстрой второй экспансии, высевают в колбу для культивирования с плотностью, составляющей или приблизительно составляющей 4×10^6 АПК/см^2.

[00861] В еще одном варианте осуществления соотношение количества АПК (включая, например, МНПК), экзогенно вводимых на день 7 быстрой второй экспансии, и количества МНПК, экзогенно вводимых в день 0 примирующей первой экспансии, выбрано из диапазона от или приблизительно от 1,1:1 до или приблизительно до 20:1.

[00862] В еще одном варианте осуществления соотношение количества АПК (включая, например, МНПК), экзогенно вводимых на день 7 быстрой второй экспансии, и количества МНПК, экзогенно вводимых в день 0 примирующей первой экспансии, выбрано из диапазона от или приблизительно от 1,1:1 до или приблизительно до 10:1.

[00863] В еще одном варианте осуществления соотношение количества АПК (включая, например, МНПК), экзогенно вводимых на день 7 быстрой второй экспансии, и количества МНПК, экзогенно вводимых в день 0 примирующей первой экспансии, выбрано из диапазона от или приблизительно от 1,1:1 до или приблизительно до 9:1.

[00864] В еще одном варианте осуществления соотношение количества АПК (включая, например, МНПК), экзогенно вводимых на день 7 быстрой второй экспансии, и количества АПК (включая, например, МНПК), экзогенно вводимых в день 0 примирующей первой экспансии, выбрано из диапазона от или приблизительно от 1,1:1 до или приблизительно до 8:1.

[00865] В еще одном варианте осуществления соотношение количества АПК (включая, например, МНПК), экзогенно вводимых на день 7 быстрой второй экспансии, и количества АПК (включая, например, МНПК), экзогенно вводимых в день 0 примирующей первой экспансии, выбрано из диапазона от или приблизительно от 1,1:1 до или приблизительно до 7:1.

[00866] В еще одном варианте осуществления соотношение количества АПК (включая, например, МНПК), экзогенно вводимых на день 7 быстрой второй экспансии, и количества АПК (включая, например, МНПК), экзогенно вводимых в день 0 примирующей первой экспансии, выбрано из диапазона от или приблизительно от 1,1:1 до или приблизительно до 6:1.

[00867] В еще одном варианте осуществления соотношение количества АПК (включая, например, МНПК), экзогенно вводимых на день 7 быстрой второй экспансии, и количества АПК (включая, например, МНПК), экзогенно вводимых в день 0 примирующей первой экспансии, выбрано из диапазона от или приблизительно от 1,1:1 до или приблизительно до 5:1.

[00868] В еще одном варианте осуществления соотношение количества АПК (включая, например, МНПК), экзогенно вводимых на день 7 быстрой второй экспансии, и

количества АПК (включая, например, МНПК), экзогенно вводимых в день 0 примирующей первой экспансии, выбрано из диапазона от или приблизительно от 1,1:1 до или приблизительно до 4:1.

[00869] В еще одном варианте осуществления соотношение количества АПК (включая, например, МНПК), экзогенно вводимых на день 7 быстрой второй экспансии, и количества АПК (включая, например, МНПК), экзогенно вводимых в день 0 примирующей первой экспансии, выбрано из диапазона от или приблизительно от 1,1:1 до или приблизительно до 3:1.

[00870] В еще одном варианте осуществления соотношение количества АПК (включая, например, МНПК), экзогенно вводимых на день 7 быстрой второй экспансии, и количества АПК (включая, например, МНПК), экзогенно вводимых в день 0 примирующей первой экспансии, выбрано из диапазона от или приблизительно от 1,1:1 до или приблизительно до 2,9:1.

[00871] В еще одном варианте осуществления соотношение количества АПК (включая, например, МНПК), экзогенно вводимых на день 7 быстрой второй экспансии, и количества АПК (включая, например, МНПК), экзогенно вводимых в день 0 примирующей первой экспансии, выбрано из диапазона от или приблизительно от 1,1:1 до или приблизительно до 2,8:1.

[00872] В еще одном варианте осуществления соотношение количества АПК (включая, например, МНПК), экзогенно вводимых на день 7 быстрой второй экспансии, и количества АПК (включая, например, МНПК), экзогенно вводимых в день 0 примирующей первой экспансии, выбрано из диапазона от или приблизительно от 1,1:1 до или приблизительно до 2,7:1.

[00873] В еще одном варианте осуществления соотношение количества АПК (включая, например, МНПК), экзогенно вводимых на день 7 быстрой второй экспансии, и количества АПК (включая, например, МНПК), экзогенно вводимых в день 0 примирующей первой экспансии, выбрано из диапазона от или приблизительно от 1,1:1 до или приблизительно до 2,6:1.

[00874] В еще одном варианте осуществления соотношение количества АПК (включая, например, МНПК), экзогенно вводимых на день 7 быстрой второй экспансии, и количества АПК (включая, например, МНПК), экзогенно вводимых в день 0 примирующей первой экспансии, выбрано из диапазона от или приблизительно от 1,1:1 до или приблизительно до 2,5:1.

[00875] В еще одном варианте осуществления соотношение количества АПК (включая, например, МНПК), экзогенно вводимых на день 7 быстрой второй экспансии, и количества АПК (включая, например, МНПК), экзогенно вводимых в день 0 примирующей первой экспансии, выбрано из диапазона от или приблизительно от 1,1:1 до или приблизительно до 2,4:1.

[00876] В еще одном варианте осуществления соотношение количества АПК (включая, например, МНПК), экзогенно вводимых на день 7 быстрой второй экспансии, и

количества АПК (включая, например, МНПК), экзогенно вводимых в день 0 примирующей первой экспансии, выбрано из диапазона от или приблизительно от 1,1:1 до или приблизительно до 2,3:1.

[00877] В еще одном варианте осуществления соотношение количества АПК (включая, например, МНПК), экзогенно вводимых на день 7 быстрой второй экспансии, и количества АПК (включая, например, МНПК), экзогенно вводимых в день 0 примирующей первой экспансии, выбрано из диапазона от или приблизительно от 1,1:1 до или приблизительно до 2,2:1.

[00878] В еще одном варианте осуществления соотношение количества АПК (включая, например, МНПК), экзогенно вводимых на день 7 быстрой второй экспансии, и количества АПК (включая, например, МНПК), экзогенно вводимых в день 0 примирующей первой экспансии, выбрано из диапазона от или приблизительно от 1,1:1 до или приблизительно до 2,1:1.

[00879] В еще одном варианте осуществления соотношение количества АПК (включая, например, МНПК), экзогенно вводимых на день 7 быстрой второй экспансии, и количества АПК (включая, например, МНПК), экзогенно вводимых в день 0 примирующей первой экспансии, выбрано из диапазона от или приблизительно от 1,1:1 до или приблизительно до 2:1.

[00880] В еще одном варианте осуществления соотношение количества АПК (включая, например, МНПК), экзогенно вводимых на день 7 быстрой второй экспансии, и количества АПК (включая, например, МНПК), экзогенно вводимых в день 0 примирующей первой экспансии, выбрано из диапазона от или приблизительно от 2:1 до или приблизительно до 10:1.

[00881] В еще одном варианте осуществления соотношение количества АПК (включая, например, МНПК), экзогенно вводимых на день 7 быстрой второй экспансии, и количества АПК (включая, например, МНПК), экзогенно вводимых в день 0 примирующей первой экспансии, выбрано из диапазона от или приблизительно от 2:1 до или приблизительно до 5:1.

[00882] В еще одном варианте осуществления соотношение количества АПК (включая, например, МНПК), экзогенно вводимых на день 7 быстрой второй экспансии, и количества АПК (включая, например, МНПК), экзогенно вводимых в день 0 примирующей первой экспансии, выбрано из диапазона от или приблизительно от 2:1 до или приблизительно до 4:1.

[00883] В еще одном варианте осуществления соотношение количества АПК (включая, например, МНПК), экзогенно вводимых на день 7 быстрой второй экспансии, и количества АПК (включая, например, МНПК), экзогенно вводимых в день 0 примирующей первой экспансии, выбрано из диапазона от или приблизительно от 2:1 до или приблизительно до 3:1.

[00884] В еще одном варианте осуществления соотношение количества АПК (включая, например, МНПК), экзогенно вводимых на день 7 быстрой второй экспансии, и

количества АПК (включая, например, МНПК), экзогенно вводимых в день 0 примирующей первой экспансии, выбрано из диапазона от или приблизительно от 2:1 до или приблизительно до 2,9:1.

[00885] В еще одном варианте осуществления соотношение количества АПК (включая, например, МНПК), экзогенно вводимых на день 7 быстрой второй экспансии, и количества АПК (включая, например, МНПК), экзогенно вводимых в день 0 примирующей первой экспансии, выбрано из диапазона от или приблизительно от 2:1 до или приблизительно до 2,8:1.

[00886] В еще одном варианте осуществления соотношение количества АПК (включая, например, МНПК), экзогенно вводимых на день 7 быстрой второй экспансии, и количества АПК (включая, например, МНПК), экзогенно вводимых в день 0 примирующей первой экспансии, выбрано из диапазона от или приблизительно от 2:1 до или приблизительно до 2,7:1.

[00887] В еще одном варианте осуществления соотношение количества АПК (включая, например, МНПК), экзогенно вводимых на день 7 быстрой второй экспансии, и количества АПК (включая, например, МНПК), экзогенно вводимых в день 0 примирующей первой экспансии, выбрано из диапазона от или приблизительно от 2:1 до или приблизительно до 2,6:1.

[00888] В еще одном варианте осуществления соотношение количества АПК (включая, например, МНПК), экзогенно вводимых на день 7 быстрой второй экспансии, и количества АПК (включая, например, МНПК), экзогенно вводимых в день 0 примирующей первой экспансии, выбрано из диапазона от или приблизительно от 2:1 до или приблизительно до 2,5:1.

[00889] В еще одном варианте осуществления соотношение количества АПК (включая, например, МНПК), экзогенно вводимых на день 7 быстрой второй экспансии, и количества АПК (включая, например, МНПК), экзогенно вводимых в день 0 примирующей первой экспансии, выбрано из диапазона от или приблизительно от 2:1 до или приблизительно до 2,4:1.

[00890] В еще одном варианте осуществления соотношение количества АПК (включая, например, МНПК), экзогенно вводимых на день 7 быстрой второй экспансии, и количества АПК (включая, например, МНПК), экзогенно вводимых в день 0 примирующей первой экспансии, выбрано из диапазона от или приблизительно от 2:1 до или приблизительно до 2,3:1.

[00891] В еще одном варианте осуществления соотношение количества АПК (включая, например, МНПК), экзогенно вводимых на день 7 быстрой второй экспансии, и количества АПК (включая, например, МНПК), экзогенно вводимых в день 0 примирующей первой экспансии, выбрано из диапазона от или приблизительно от 2:1 до или приблизительно до 2,2:1.

[00892] В еще одном варианте осуществления соотношение количества АПК (включая, например, МНПК), экзогенно вводимых на день 7 быстрой второй экспансии, и

количества АПК (включая, например, МНПК), экзогенно вводимых в день 0 примирующей первой экспансии, выбрано из диапазона от или приблизительно от 2:1 до или приблизительно до 2,1:1.

[00893] В еще одном варианте осуществления соотношение количества АПК (включая, например, МНПК), экзогенно вводимых на день 7 быстрой второй экспансии, и количества АПК (включая, например, МНПК), экзогенно вводимых в день 0 примирующей первой экспансии, составляет или приблизительно составляет 2:1.

[00894] В еще одном варианте осуществления соотношение количества АПК (включая, например, МНПК), экзогенно вводимых на день 7 быстрой второй экспансии, и количества АПК (включая, например, МНПК), экзогенно вводимых в день 0 примирующей первой экспансии, составляет или приблизительно составляет 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.

[00895] В еще одном варианте осуществления количество АПК (включая, например, МНПК), экзогенно вводимых в день 0 примирующей первой экспансии, составляет или приблизительно составляет 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, МНПК), и количество АПК (включая, например, МНПК), экзогенно вводимых на день 7 быстрой второй экспансии, составляет или приблизительно составляет $3,5\times10^8$, $3,6\times10^8$, $3,7\times10^8$, $3,8\times10^8$, $3,9\times10^8$, 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, МНПК).

[00896] В еще одном варианте осуществления количество АПК (включая, например, МНПК), экзогенно вводимых в день 0 примирующей первой экспансии, выбрано из диапазона от или приблизительно от 1×10^8 АПК (включая, например, МНПК) до или приблизительно до $3,5\times10^8$ АПК (включая, например, МНПК), и количество АПК (включая, например, МНПК), экзогенно вводимых на день 7 быстрой второй экспансии, выбрано из диапазона от или приблизительно от $3,5\times10^8$ АПК (включая, например, МНПК) до или приблизительно до 1×10^9 АПК (включая, например, МНПК).

[00897] В еще одном варианте осуществления количество АПК (включая, например, МНПК), экзогенно вводимых в день 0 примирующей первой экспансии, выбрано из диапазона от или приблизительно от $1,5\times10^8$ АПК до или приблизительно до 3×10^8 АПК (включая, например, МНПК), и количество АПК (включая, например, МНПК), экзогенно вводимых на день 7 быстрой второй экспансии, выбрано из диапазона от или

приблизительно от 4×10^8 АПК (включая, например, МНПК) до или приблизительно до $7,5\times10^8$ АПК (включая, например, МНПК).

[00898] В еще одном варианте осуществления количество АПК (включая, например, МНПК), экзогенно вводимых в день 0 примирующей первой экспансии, выбрано из диапазона от или приблизительно от 1×10^8 АПК (включая, например, МНПК) до или приблизительно до $3,5\times10^8$ АПК (включая, например, МНПК), и количество АПК (включая, например, МНПК), экзогенно вводимых на день 7 быстрой второй экспансии, выбрано из диапазона от или приблизительно от $3,5\times10^8$ АПК (включая, например, МНПК) до или приблизительно до 1×10^9 АПК (включая, например, МНПК).

[00899] В еще одном варианте осуществления количество АПК (включая, например, МНПК), экзогенно вводимых в день 0 примирующей первой экспансии, выбрано из диапазона от или приблизительно от $1,5\times10^8$ АПК до или приблизительно до 3×10^8 АПК (включая, например, МНПК), и количество АПК (включая, например, МНПК), экзогенно вводимых на день 7 быстрой второй экспансии, выбрано из диапазона от или приблизительно от 4×10^8 АПК (включая, например, МНПК) до или приблизительно до $7,5\times10^8$ АПК (включая, например, МНПК).

[00900] В еще одном варианте осуществления количество АПК (включая, например, МНПК), экзогенно вводимых в день 0 примирующей первой экспансии, выбрано из диапазона от или приблизительно от 2×10^8 АПК (включая, например, МНПК) до или приблизительно до $2,5\times10^8$ АПК (включая, например, МНПК), и количество АПК (включая, например, МНПК), экзогенно вводимых на день 7 быстрой второй экспансии, выбрано из диапазона от или приблизительно от $4,5\times10^8$ АПК (включая, например, МНПК) до или приблизительно до $5,5\times10^8$ АПК (включая, например, МНПК).

[00901] В еще одном варианте осуществления количество АПК (включая, например, МНПК), экзогенно вводимых в день 0 примирующей первой экспансии, составляет или приблизительно составляет $2,5\times10^8$ АПК (включая, например, МНПК), и количество АПК (включая, например, МНПК), экзогенно вводимых на день 7 быстрой второй экспансии, составляет или приблизительно составляет 5×10^8 АПК (включая, например, МНПК).

[00902] В одном из вариантов осуществления количество слоев АПК (включая, например, МНПК), добавляемых в день 0 примирующей первой экспансии, составляет приблизительно половину от количества слоев АПК (включая, например, МНПК), добавляемых на день 7 быстрой второй экспансии. В отдельных вариантах осуществления способ включает добавление слоев антигенпрезентирующих клеток в день 0 примирующей первой экспансии к первой популяции TIL, и добавление слоев антигенпрезентирующих клеток на день 7 ко второй популяции TIL, где количество слоев антигенпрезентирующих клеток, добавляемых в день 0, составляет приблизительно 50% от количества слоев антигенпрезентирующих клеток, добавляемых на день 7.

[00903] В еще одном варианте осуществления количество слоев АПК (включая, например, МНПК), экзогенно вводимых на день 7 быстрой второй экспансии, больше, чем количество слоев АПК (включая, например, МНПК), экзогенно вводимых в день 0

примирующей первой экспансии.

[00904] В еще одном варианте осуществления день 0 примирующей первой экспансии проводят в присутствии наслоенных АПК (включая, например, МНПК) со средней толщиной, составляющей или приблизительно составляющей 2 клеточных слоя, и день 7 быстрой второй экспансии проводят в присутствии наслоенных АПК (включая, например, МНПК) со средней толщиной, составляющей или приблизительно составляющей 4 клеточных слоя.

[00905] В еще одном варианте осуществления день 0 примирующей первой экспансии проводят в присутствии наслоенных АПК (включая, например, МНПК) со средней толщиной, составляющей или приблизительно составляющей один клеточный слой, и день 7 быстрой второй экспансии проводят в присутствии наслоенных АПК (включая, например, МНПК) со средней толщиной, составляющей или приблизительно составляющей 3 клеточных слоя.

[00906] В еще одном варианте осуществления день 0 примирующей первой экспансии проводят в присутствии наслоенных АПК (включая, например, МНПК) со средней толщиной от или приблизительно от 1,5 клеточных слоев до или приблизительно до 2,5 клеточных слоев, и день 7 быстрой второй экспансии проводят в присутствии наслоенных АПК (включая, например, МНПК) со средней толщиной, составляющей или приблизительно составляющей 3 клеточных слоя.

[00907] В еще одном варианте осуществления день 0 примирующей первой экспансии проводят в присутствии наслоенных АПК (включая, например, МНПК) со средней толщиной, составляющей или приблизительно составляющей один клеточный слой, и день 7 быстрой второй экспансии проводят в присутствии наслоенных АПК (включая, например, МНПК) со средней толщиной, составляющей или приблизительно составляющей 2 клеточных слоя.

[00908] В еще одном варианте осуществления день 0 примирующей первой экспансии проводят в присутствии наслоенных АПК (включая, например, МНПК) со средней толщиной, составляющей или приблизительно составляющей 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 клеточных слоя, и день 7 быстрой второй экспансии проводят в присутствии наслоенных АПК (включая, например, МНПК) со средней толщиной, составляющей или приблизительно составляющей 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 клеточных слоев.

[00909] В еще одном варианте осуществления день 0 примирующей первой экспансии проводят в присутствии наслоенных АПК (включая, например, МНПК) со средней толщиной от или приблизительно от 1 клеточного слоя до или приблизительно до 2 клеточных слоев, и день 7 быстрой второй экспансии проводят в присутствии наслоенных АПК (включая, например, МНПК) со средней толщиной от или приблизительно от 3 клеточных слоев до или приблизительно до 10 клеточных слоев.

[00910] В еще одном варианте осуществления день 0 примирующей первой экспансии проводят в присутствии наслоенных АПК (включая, например, МНПК) со средней толщиной от или приблизительно от 2 клеточных слоев до или приблизительно до 3 клеточных слоев, и день 7 быстрой второй экспансии проводят в присутствии наслоенных АПК (включая, например, МНПК) со средней толщиной от или приблизительно от 4 клеточных слоев до или приблизительно до 8 клеточных слоев.

[00911] В еще одном варианте осуществления день 0 примирующей первой экспансии проводят в присутствии наслоенных АПК (включая, например, МНПК) со средней толщиной, составляющей или приблизительно составляющей 2 клеточных слоя, и день 7 быстрой второй экспансии проводят в присутствии наслоенных АПК (включая, например, МНПК) со средней толщиной от или приблизительно от 4 клеточных слоев до или приблизительно до 8 клеточных слоев.

[00912] В еще одном варианте осуществления день 0 примирующей первой экспансии проводят в присутствии наслоенных АПК (включая, например, МНПК) со средней толщиной, составляющей или приблизительно составляющей 1, 2 или 3 клеточных слоя, и день 7 быстрой второй экспансии проводят в присутствии наслоенных АПК (включая, например, МНПК) со средней толщиной, составляющей или приблизительно составляющей 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 клеточных слоев.

[00913] В еще одном варианте осуществления день 0 примирующей первой экспансии проводят в присутствии наслоенных АПК (включая, например, МНПК) с первой средней толщиной, равной первому количеству слоев АПК (включая, например, МНПК), и день 7 быстрой второй экспансии проводят в присутствии наслоенных АПК (включая, например, МНПК) со второй средней толщиной, равной второму количеству слоев АПК (включая, например, МНПК), где соотношение указанного первого количества слоев АПК (включая, например, МНПК) и указанного второго количества слоев АПК (включая, например, МНПК) выбрано из диапазона от или приблизительно от 1:1,1 до или приблизительно до 1:10.

[00914] В еще одном варианте осуществления день 0 примирующей первой экспансии проводят в присутствии наслоенных АПК (включая, например, МНПК) с первой средней толщиной, равной первому количеству слоев АПК (включая, например, МНПК), и день 7 быстрой второй экспансии проводят в присутствии наслоенных АПК (включая, например, МНПК) со второй средней толщиной, равной второму количеству слоев АПК (включая, например, МНПК), где соотношение указанного первого количества слоев АПК (включая, например, МНПК) и указанного второго количества слоев АПК (включая, например, МНПК) выбрано из диапазона от или приблизительно от 1:1,1 до или приблизительно до 1:8.

[00915] В еще одном варианте осуществления день 0 примирующей первой экспансии проводят в присутствии наслоенных АПК (включая, например, МНПК) с первой средней толщиной, равной первому количеству слоев АПК (включая, например, МНПК), и день 7 быстрой второй экспансии проводят в присутствии наслоенных АПК (включая,

например, МНПК) со второй средней толщиной, равной второму количеству слоев АПК (включая, например, МНПК), где соотношение указанного первого количества слоев АПК (включая, например, МНПК) и указанного второго количества слоев АПК (включая, например, МНПК) выбрано из диапазона от или приблизительно от 1:1,1 до или приблизительно до 1:7.

[00916] В еще одном варианте осуществления день 0 примирующей первой экспансии проводят в присутствии наслоенных АПК (включая, например, МНПК) с первой средней толщиной, равной первому количеству слоев АПК (включая, например, МНПК), и день 7 быстрой второй экспансии проводят в присутствии наслоенных АПК (включая, например, МНПК) со второй средней толщиной, равной второму количеству слоев АПК (включая, например, МНПК), где соотношение указанного первого количества слоев АПК (включая, например, МНПК) и указанного второго количества слоев АПК (включая, например, МНПК) выбрано из диапазона от или приблизительно от 1:1,1 до или приблизительно до 1:6.

[00917] В еще одном варианте осуществления день 0 примирующей первой экспансии проводят в присутствии наслоенных АПК (включая, например, МНПК) с первой средней толщиной, равной первому количеству слоев АПК (включая, например, МНПК), и день 7 быстрой второй экспансии проводят в присутствии наслоенных АПК (включая, например, МНПК) со второй средней толщиной, равной второму количеству слоев АПК (включая, например, МНПК), где соотношение указанного первого количества слоев АПК (включая, например, МНПК) и указанного второго количества слоев АПК (включая, например, МНПК) выбрано из диапазона от или приблизительно от 1:1,1 до или приблизительно до 1:5.

[00918] В еще одном варианте осуществления день 0 примирующей первой экспансии проводят в присутствии наслоенных АПК (включая, например, МНПК) с первой средней толщиной, равной первому количеству слоев АПК (включая, например, МНПК), и день 7 быстрой второй экспансии проводят в присутствии наслоенных АПК (включая, например, МНПК) со второй средней толщиной, равной второму количеству слоев АПК (включая, например, МНПК), где соотношение указанного первого количества слоев АПК (включая, например, МНПК) и указанного второго количества слоев АПК (включая, например, МНПК) выбрано из диапазона от или приблизительно от 1:1,1 до или приблизительно до 1:4.

[00919] В еще одном варианте осуществления день 0 примирующей первой экспансии проводят в присутствии наслоенных АПК (включая, например, МНПК) с первой средней толщиной, равной первому количеству слоев АПК (включая, например, МНПК), и день 7 быстрой второй экспансии проводят в присутствии наслоенных АПК (включая, например, МНПК) со второй средней толщиной, равной второму количеству слоев АПК (включая, например, МНПК), где соотношение указанного первого количества слоев АПК (включая, например, МНПК) и указанного второго количества слоев АПК (включая, например, МНПК) выбрано из диапазона от или приблизительно от 1:1,1 до или

приблизительно до 1:3.

[00920] В еще одном варианте осуществления день 0 примирующей первой экспансии проводят в присутствии наслоенных АПК (включая, например, МНПК) с первой средней толщиной, равной первому количеству слоев АПК (включая, например, МНПК), и день 7 быстрой второй экспансии проводят в присутствии наслоенных АПК (включая, например, МНПК) со второй средней толщиной, равной второму количеству слоев АПК (включая, например, МНПК), где соотношение указанного первого количества слоев АПК (включая, например, МНПК) и указанного второго количества слоев АПК (включая, например, МНПК) выбрано из диапазона от или приблизительно от 1:1,1 до или приблизительно до 1:2.

[00921] В еще одном варианте осуществления день 0 примирующей первой экспансии проводят в присутствии наслоенных АПК (включая, например, МНПК) с первой средней толщиной, равной первому количеству слоев АПК (включая, например, МНПК), и день 7 быстрой второй экспансии проводят в присутствии наслоенных АПК (включая, например, МНПК) со второй средней толщиной, равной второму количеству слоев АПК (включая, например, МНПК), где соотношение указанного первого количества слоев АПК (включая, например, МНПК) и указанного второго количества слоев АПК (включая, например, МНПК) выбрано из диапазона от или приблизительно от 1:1,2 до или приблизительно до 1:8.

[00922] В еще одном варианте осуществления день 0 примирующей первой экспансии проводят в присутствии наслоенных АПК (включая, например, МНПК) с первой средней толщиной, равной первому количеству слоев АПК (включая, например, МНПК), и день 7 быстрой второй экспансии проводят в присутствии наслоенных АПК (включая, например, МНПК) со второй средней толщиной, равной второму количеству слоев АПК (включая, например, МНПК), где соотношение указанного первого количества слоев АПК (включая, например, МНПК) и указанного второго количества слоев АПК (включая, например, МНПК) выбрано из диапазона от или приблизительно от 1:1,3 до или приблизительно до 1:7.

[00923] В еще одном варианте осуществления день 0 примирующей первой экспансии проводят в присутствии наслоенных АПК (включая, например, МНПК) с первой средней толщиной, равной первому количеству слоев АПК (включая, например, МНПК), и день 7 быстрой второй экспансии проводят в присутствии наслоенных АПК (включая, например, МНПК) со второй средней толщиной, равной второму количеству слоев АПК (включая, например, МНПК), где соотношение указанного первого количества слоев АПК (включая, например, МНПК) и указанного второго количества слоев АПК (включая, например, МНПК) выбрано из диапазона от или приблизительно от 1:1,4 до или приблизительно до 1:6.

[00924] В еще одном варианте осуществления день 0 примирующей первой экспансии проводят в присутствии наслоенных АПК (включая, например, МНПК) с первой средней толщиной, равной первому количеству слоев АПК (включая, например, МНПК), и

день 7 быстрой второй экспансии проводят в присутствии наслоенных АПК (включая, например, МНПК) со второй средней толщиной, равной второму количеству слоев АПК (включая, например, МНПК), где соотношение указанного первого количества слоев АПК (включая, например, МНПК) и указанного второго количества слоев АПК (включая, например, МНПК) выбрано из диапазона от или приблизительно от 1:1,5 до или приблизительно до 1:5.

[00925] В еще одном варианте осуществления день 0 примирующей первой экспансии проводят в присутствии наслоенных АПК (включая, например, МНПК) с первой средней толщиной, равной первому количеству слоев АПК (включая, например, МНПК), и день 7 быстрой второй экспансии проводят в присутствии наслоенных АПК (включая, например, МНПК) со второй средней толщиной, равной второму количеству слоев АПК (включая, например, МНПК), где соотношение указанного первого количества слоев АПК (включая, например, МНПК) и указанного второго количества слоев АПК (включая, например, МНПК) выбрано из диапазона от или приблизительно от 1:1,6 до или приблизительно до 1:4.

[00926] В еще одном варианте осуществления день 0 примирующей первой экспансии проводят в присутствии наслоенных АПК (включая, например, МНПК) с первой средней толщиной, равной первому количеству слоев АПК (включая, например, МНПК), и день 7 быстрой второй экспансии проводят в присутствии наслоенных АПК (включая, например, МНПК) со второй средней толщиной, равной второму количеству слоев АПК (включая, например, МНПК), где соотношение указанного первого количества слоев АПК (включая, например, МНПК) и указанного второго количества слоев АПК (включая, например, МНПК) выбрано из диапазона от или приблизительно от 1:1,7 до или приблизительно до 1:3,5.

[00927] В еще одном варианте осуществления день 0 примирующей первой экспансии проводят в присутствии наслоенных АПК (включая, например, МНПК) с первой средней толщиной, равной первому количеству слоев АПК (включая, например, МНПК), и день 7 быстрой второй экспансии проводят в присутствии наслоенных АПК (включая, например, МНПК) со второй средней толщиной, равной второму количеству слоев АПК (включая, например, МНПК), где соотношение указанного первого количества слоев АПК (включая, например, МНПК) и указанного второго количества слоев АПК (включая, например, МНПК) выбрано из диапазона от или приблизительно от 1:1,8 до или приблизительно до 1:3.

[00928] В еще одном варианте осуществления день 0 примирующей первой экспансии проводят в присутствии наслоенных АПК (включая, например, МНПК) с первой средней толщиной, равной первому количеству слоев АПК (включая, например, МНПК), и день 7 быстрой второй экспансии проводят в присутствии наслоенных АПК (включая, например, МНПК) со второй средней толщиной, равной второму количеству слоев АПК (включая, например, МНПК), где соотношение указанного первого количества слоев АПК (включая, например, МНПК) и указанного второго количества слоев АПК (включая,

например, МНПК) выбрано из диапазона от или приблизительно от 1:1,9 до или приблизительно до 1:2,5.

[00929] В еще одном варианте осуществления день 0 примирующей первой экспансии проводят в присутствии наслоенных АПК (включая, например, МНПК) с первой средней толщиной, равной первому количеству слоев АПК (включая, например, МНПК), и день 7 быстрой второй экспансии проводят в присутствии наслоенных АПК (включая, например, МНПК) со второй средней толщиной, равной второму количеству слоев АПК (включая, например, МНПК), где соотношение указанного первого количества слоев АПК (включая, например, МНПК) и указанного второго количества слоев АПК (включая, например, МНПК) составляет или приблизительно составляет 1: 2.

[00930] В еще одном варианте осуществления день 0 примирующей первой экспансии проводят в присутствии наслоенных АПК (включая, например, МНПК) с первой средней толщиной, равной первому количеству слоев АПК (включая, например, МНПК), и день 7 быстрой второй экспансии проводят в присутствии наслоенных АПК (включая, например, МНПК) со второй средней толщиной, равной второму количеству слоев АПК (включая, например, МНПК), где соотношение указанного первого количества слоев АПК (включая, например, МНПК) и указанного второго количества слоев АПК (включая, например, МНПК) выбрано из или приблизительно из 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.

[00931] В некоторых вариантах осуществления количество АПК при примирующей первой экспансии выбрано из диапазона от приблизительно $1,0\times10^6$ АПК/см^2 до приблизительно $4,5\times10^6$ АПК/см^2, и количество АПК при быстрой второй экспансии выбрано из диапазона от приблизительно $2,5\times10^6$ АПК/см^2 до приблизительно $7,5\times10^6$ АПК/см^2.

[00932] В некоторых вариантах осуществления количество АПК при примирующей первой экспансии выбрано из диапазона от приблизительно $1,5\times10^6$ АПК/см^2 до приблизительно $3,5\times10^6$ АПК/см^2, и количество АПК при быстрой второй экспансии выбрано из диапазона от приблизительно $3,5\times10^6$ АПК/см^2 до приблизительно $6,0\times10^6$ АПК/см^2.

[00933] В некоторых вариантах осуществления количество АПК при примирующей первой экспансии выбрано из диапазона от приблизительно $2,0\times10^6$ АПК/см^2 до приблизительно $3,0\times10^6$ АПК/см^2, и количество АПК при быстрой второй экспансии выбрано из диапазона от приблизительно $4,0\times10^6$ АПК/см^2 до приблизительно $5,5\times10^6$ АПК/см^2.

Необязательные компоненты клеточной среды

1. Антитела к CD3

[00934] В некоторых вариантах осуществления культуральные среды, используемые в способах экспансии, описанных в настоящем документе (см., например, фиг. 1 (в частности, например, фиг. 1B и/или фиг. 1C)), включают антитело к CD3. Антитело к CD3 в комбинации с IL-2 индуцирует активацию Т-клеток и деление клеток в популяции TIL. Этот эффект может наблюдаться с полноразмерными антителами, а также с фрагментами Fab и F(ab')2, причем первые обычно являются предпочтительными; см., например, источник Tsoukas *et al.*, *J. Immunol.* **1985,** *135,* 1719, настоящим включенный посредством ссылки в полном объеме.

[00935] Специалистам в данной области техники будет ясно, что существует ряд подходящих антител к CD3 человека, подходящих для применения в изобретении, включая поликлональные и моноклональные антитела к CD3 человека от различных млекопитающих, включая, не ограничиваясь перечисленным, антитела мышей, человека, приматов, крыс и собак. В частных вариантах осуществления используют антитело к CD3 OKT3 (коммерчески доступное от Ortho-McNeil, Раритан, Нью-Джерси или Miltenyi Biotech, Оберн, Калифорния).

ТАБЛИЦА 5: Аминокислотные последовательности 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	QIVLTQSPAI MSASPGEKVT MTCSASSSVS YMNWYQQKSG TSPKRWIYDT SKLASGVPAH 60

муромонаба	FRGSGSGTSY SLTISGMEAE DAATYYCQQW SSNPFTFGSG TKLEINRADT APTVSIFPPS 120 SEQLTSGGAS VVCFLNNFYP KDINVKWKID GSERQNGVLN SWTDQDSKDS TYSMSSTLTL 180 TKDEYERHNS YTCEATHKTS TSPIVKSFNR NEC 213

2. Агонисты 4-1BB (CD137)

[00936] В одном из вариантов осуществления среда для культивирования клеток примирующей первой экспансии и/или быстрой второй экспансии содержит агонист TNFRSF. В одном из вариантов осуществления агонист TNFRSF представляет собой агонист 4-1BB (CD137). Агонист 4-1BB может представлять собой любую связывающую 4-1BB молекулу, известную в данной области техники. Связывающая 4-1BB молекула может представлять собой моноклональное антитело или слитый белок, способный связываться с 4-1BB человека или млекопитающего. 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 молекулы иммуноглобулина. Агонист 4-1BB или связывающая 4-1BB молекула может иметь как тяжелую, так и легкую цепь. В контексте настоящего документа термин «связывающая молекула» также включает антитела (включая полноразмерные антитела), моноклональные антитела (включая полноразмерные моноклональные антитела), поликлональные антитела, полиспецифические антитела (например, биспецифические антитела), человеческие, гуманизированные или химерные антитела и фрагменты антител, например, фрагменты Fab, фрагменты F(ab′), фрагменты, продуцируемые библиотекой экспрессии Fab, эпитоп-связывающие фрагменты любого из вышеперечисленных и генетически сконструированные формы антител, например, молекулы scFv, которые связываются с 4-1BB. В одном из вариантов осуществления агонист 4-1BB представляет собой антигенсвязывающий белок, который является полностью человеческим антителом. В одном из вариантов осуществления агонист 4-1BB представляет собой антигенсвязывающий белок, который является гуманизированным антителом. В некоторых вариантах осуществления агонисты 4-1BB для применения в раскрытых в настоящем документе способах и композициях включают антитела к 4-1BB, антитела к 4-1BB человека, мышиные антитела к 4-1BB, антитела млекопитающих к 4-1BB, моноклональные антитела к 4-1BB, поликлональные антитела к 4-1BB, химерные антитела к 4-1BB, аднектины к 4-1BB, доменные антитела к 4-1BB, одноцепочечные фрагменты к 4-1BB, фрагменты тяжелой цепи к 4-1BB, фрагменты легкой цепи к 4-1BB, слитые белки к 4-1BB и их фрагменты, производные, конъюгаты, варианты или биоаналоги. Известно, что агонистические антитела к 4-1BB вызывают сильные иммунные ответы. Lee, *et al.*, *PLOS One* **2013**, *8,* e69677. В предпочтительном варианте осуществления агонист 4-1BB представляет собой агонистическое гуманизированное или полностью человеческое моноклональное антитело (т. е. антитело, полученное из одной клеточной линии) к 4-1BB.

В одном из вариантов осуществления агонист 4-1BB представляет собой EU-101 (Eutilex Co. Ltd.), утомилумаб или урелумаб, или их фрагмент, производное, конъюгат, вариант или биоаналог. В предпочтительном варианте осуществления агонист 4-1BB представляет собой утомилумаб или урелумаб, или их фрагмент, производное, конъюгат, вариант или биоаналог.

[00937] В предпочтительном варианте осуществления агонист 4-1BB или связывающая 4-1BB молекула также может представлять собой слитый белок. В предпочтительном варианте осуществления мультимерный агонист 4-1BB, такой как тримерный или гексамерный агонист 4-1BB (с тремя или шестью лиганд-связывающими доменами), может индуцировать более высокую кластеризацию рецептора (4-1BBL) и образование внутриклеточного сигнального комплекса по сравнению с агонистическим моноклональным антителом, которое обычно имеет два лиганд-связывающих домена. Тримерные (трехвалентные) или гексамерные (или шестивалентные), или имеющие более высокую валентность слитые белки, содержащие три связывающих TNFRSF домена и IgG1-Fc, и, необязательно, дополнительно связывающие два или более из этих слитых белков, описаны, например, в Gieffers, *et al.*, *Mol. Cancer Therapeutics* **2013,** *12,* 2735-47.

[00938] Известно, что агонистические антитела к 4-1BB и слитые белки вызывают сильные иммунные ответы. В предпочтительном варианте осуществления агонист 4-1BB представляет собой моноклональное антитело или слитый белок, который специфически связывается с антигеном 4-1BB способом, достаточным для снижения токсичности. В некоторых вариантах осуществления агонист 4-1BB представляет собой агонистическое моноклональное антитело к 4-1BB или слитый белок, который устраняет антителозависимую клеточную токсичность (АЗКЦ), например, цитотоксичность NK-клеток. В некоторых вариантах осуществления агонист 4-1BB представляет собой агонистическое моноклональное антитело к 4-1BB или слитый белок, который устраняет антителозависимый клеточный фагоцитоз (АЗКФ). В некоторых вариантах осуществления агонист 4-1BB представляет собой агонистическое моноклональное антитело к 4-1BB или слитый белок, который устраняет комплемент-зависимую цитотоксичность (КЗЦ). В некоторых вариантах осуществления агонист 4-1BB представляет собой агонистическое моноклональное антитело к 4-1BB или слитый белок, который устраняет функциональность области Fc.

[00939] В некоторых вариантах осуществления агонисты 4-1BB характеризуются связыванием с 4-1BB человека (SEQ ID NO:9) с высокой аффинностью и агонистической активностью. В одном из вариантов осуществления агонист 4-1BB представляет собой связывающую молекулу, которая связывается с 4-1BB человека (SEQ ID NO:9). В одном из вариантов осуществления агонист 4-1BB представляет собой связывающую молекулу, которая связывается с мышиным 4-1BB (SEQ ID NO:10). Аминокислотные последовательности антигена 4-1BB, с которым связывается агонист 4-1BB или связывающая 4-1BB молекула, обобщены в таблице 6.

ТАБЛИЦА 6. Аминокислотные последовательности антигенов 4-1BB.

Идентификатор	Последовательность (однобуквенные обозначения аминокислот)
SEQ ID NO:9 4-1BB человека, член 9 надсемейства рецепторов фактора 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 мышиный 4-1BB, член 9 надсемейства рецепторов фактора 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

[00940] В некоторых вариантах осуществления описанные композиции, процессы и способы включают агонист 4-1BB, который связывает человеческий или мышиный 4-1BB с K_D приблизительно 100 пМ или ниже, связывает человеческий или мышиный 4-1BB с K_D приблизительно 90 пМ или ниже, связывает человеческий или мышиный 4-1BB с K_D приблизительно 80 пМ или ниже, связывает человеческий или мышиный 4-1BB с K_D приблизительно 70 пМ или ниже, связывает человеческий или мышиный 4-1BB с K_D приблизительно 60 пМ или ниже, связывает человеческий или мышиный 4-1BB с K_D приблизительно 50 пМ или ниже, связывает человеческий или мышиный 4-1BB с K_D приблизительно 40 пМ или ниже, или связывает человеческий или мышиный 4-1BB с K_D приблизительно 30 пМ или ниже.

[00941] В некоторых вариантах осуществления описанные композиции, процессы и способы включают агонист 4-1BB, который связывается с человеческим или мышиным 4-1BB с k_{assoc} приблизительно $7,5 \times 10^5$ 1/М·с или быстрее, связывается с человеческим или мышиным 4-1BB с k_{assoc} приблизительно $7,5 \times 10^5$ 1/М·с или быстрее, связывается с человеческим или мышиным 4-1BB с k_{assoc} приблизительно 8×10^5 1/М·с или быстрее, связывается с человеческим или мышиным 4-1BB с k_{assoc} приблизительно $8,5 \times 10^5$ 1/М·с или быстрее, связывается с человеческим или мышиным 4-1BB с k_{assoc} приблизительно $9 \times$

10^5 1/M·c или быстрее, связывается с человеческим или мышиным 4-1BB с k_{assoc} приблизительно 9,5 × 10^5 1/M·c или быстрее, или связывается с человеческим или мышиным 4-1BB с k_{assoc} приблизительно 1 × 10^6 1/M·c или быстрее.

[00942] В некоторых вариантах осуществления описанные композиции, процессы и способы включают агонист 4-1BB, который связывается с человеческим или мышиным 4-1BB с k_{dissoc} приблизительно 2 × 10^{-5} 1/c или медленнее, связывается с человеческим или мышиным 4-1BB с k_{dissoc} приблизительно 2,1 × 10^{-5} 1/c или медленнее, связывается с человеческим или мышиным 4-1BB с k_{dissoc} приблизительно 2,2 × 10^{-5} 1/c или медленнее, связывается с человеческим или мышиным 4-1BB с k_{dissoc} приблизительно 2,3 × 10^{-5} 1/c или медленнее, связывается с человеческим или мышиным 4-1BB с k_{dissoc} приблизительно 2,4 × 10^{-5} 1/c или медленнее, связывается с человеческим или мышиным 4-1BB с k_{dissoc} приблизительно 2,5 × 10^{-5} 1/c или медленнее, связывается с человеческим или мышиным 4-1BB с k_{dissoc} приблизительно 2,6 × 10^{-5} 1/c или медленнее, или связывается с человеческим или мышиным 4-1BB с k_{dissoc} приблизительно 2,7 × 10^{-5} 1/c или медленнее, связывается с человеческим или мышиным 4-1BB с k_{dissoc} приблизительно 2,8 × 10^{-5} 1/c или медленнее, связывается с человеческим или мышиным 4-1BB с k_{dissoc} приблизительно 2,9 × 10^{-5} 1/c или медленнее, или связывается с человеческим или мышиным 4-1BB с k_{dissoc} приблизительно 3 × 10^{-5} 1/c или медленнее.

[00943] В некоторых вариантах осуществления описанные композиции, процессы и способы включают агонист 4-1BB, который связывается с человеческим или мышиным 4-1BB с IC_{50} приблизительно 10 нМ или ниже, связывается с человеческим или мышиным 4-1BB с IC_{50} приблизительно 9 нМ или ниже, связывается с человеческим или мышиным 4-1BB с IC_{50} приблизительно 8 нМ или ниже, связывается с человеческим или мышиным 4-1BB с IC_{50} приблизительно 7 нМ или ниже, связывается с человеческим или мышиным 4-1BB с IC_{50} приблизительно 6 нМ или ниже, связывается с человеческим или мышиным 4-1BB с IC_{50} приблизительно 5 нМ или ниже, связывается с человеческим или мышиным 4-1BB с IC_{50} приблизительно 4 нМ или ниже, связывается с человеческим или мышиным 4-1BB с IC_{50} приблизительно 3 нМ или ниже, связывается с человеческим или мышиным 4-1BB с IC_{50} приблизительно 2 нМ или ниже, или связывается с человеческим или мышиным 4-1BB с IC_{50} приблизительно 1 нМ или ниже.

[00944] В предпочтительном варианте осуществления 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, *Homo sapiens* (полностью человеческое) моноклональное антитело к [*Homo sapiens* TNFRSF9 (член 9 надсемейства рецепторов фактора некроза опухоли (TNFR), 4-1BB, Т-клеточный антиген ILA, CD137)]. Аминокислотные последовательности утомилумаба представлены в таблице 7. Утомилумаб содержит сайты гликозилирования при Asn59 и Asn292; внутрицепочечные дисульфидные мостики в тяжелой цепи в положениях 22-96 (V_H-V_L), 143-199 (C_H1-C_L), 256-316 (C_H2) и 362-420 (C_H3); внутрицепочечные дисульфидные мостики в легкой цепи в

положениях 22'-87' (V_H-V_L) и 136'-195' (C_H1-C_L); межцепочечные дисульфидные мостики между тяжелыми цепями в положениях изоформы IgG2A 218-218, 219-219, 222-222 и 225-225, в положениях изоформы IgG2A/B 218-130, 219-219, 222-222 и 225-225, и в положениях изоформы IgG2B 219-130 (2), 222-222 и 225-225; и межцепочечные дисульфидные мостики между тяжелой цепью и легкой цепью в положениях изоформы IgG2A 130-213' (2), положениях изоформы IgG2A/B 218-213' и 130-213' и в положениях изоформы IgG2B 218-213' (2). Получение и свойства утомилумаба и его вариантов и фрагментов описаны в патентах США №№ 8821867, 8337850 и 9468678, и публикации международной патентной заявки WO 2012/032433 A1, содержание каждого из которых включено в настоящий документ посредством ссылки. Доклинические характеристики утомилумаба описаны в источнике Fisher, *et al.*, *Cancer Immunolog. & Immunother.* **2012,** *61,* 1721-33. Текущие клинические исследования утомилумаба при различных гематологических и солидных опухолях включают идентификаторы NCT02444793, NCT01307267, NCT02315066 и NCT02554812 на сайте Health clinicaltrials.gov Национального института здравоохранения США.

[00945] В одном из вариантов осуществления агонист 4-1BB содержит тяжелую цепь, представленную SEQ ID NO:11, и легкую цепь, представленную SEQ ID NO:12. В одном из вариантов осуществления агонист 4-1BB содержит тяжелую и легкую цепи, имеющие последовательности, представленные в SEQ ID NO:11 и SEQ ID NO:12, соответственно, или их антигенсвязывающие фрагменты, фрагменты Fab, одноцепочечные вариабельные фрагменты (scFv), варианты или конъюгаты. В одном из вариантов осуществления агонист 4-1BB содержит тяжелую и легкую цепи, каждая из которых по меньшей мере на 99% идентична последовательностям, представленным в SEQ ID NO:11 и SEQ ID NO:12, соответственно. В одном из вариантов осуществления агонист 4-1BB содержит тяжелую и легкую цепи, каждая из которых по меньшей мере на 98% идентична последовательностям, представленным в SEQ ID NO:11 и SEQ ID NO:12, соответственно. В одном из вариантов осуществления агонист 4-1BB содержит тяжелую и легкую цепи, каждая из которых по меньшей мере на 97% идентична последовательностям, представленным в SEQ ID NO:11 и SEQ ID NO:12, соответственно. В одном из вариантов осуществления агонист 4-1BB содержит тяжелую и легкую цепи, каждая из которых по меньшей мере на 96% идентична последовательностям, представленным в SEQ ID NO:11 и SEQ ID NO:12, соответственно. В одном из вариантов осуществления агонист 4-1BB содержит тяжелую и легкую цепи, каждая из которых по меньшей мере на 95% идентична последовательностям, представленным в SEQ ID NO:11 и SEQ ID NO:12, соответственно.

[00946] В одном из вариантов осуществления агонист 4-1BB содержит CDR или вариабельные области (VR) тяжелой и легкой цепи утомилумаба. В одном из вариантов осуществления вариабельная область тяжелой цепи (V_H) агониста 4-1BB содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO:13, а вариабельная область легкой цепи (V_L) агониста 4-1BB содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO:14, и их консервативные аминокислотные замены. В одном из вариантов осуществления 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. В одном из вариантов осуществления 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. В одном из вариантов осуществления 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. В одном из вариантов осуществления 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. В одном из вариантов осуществления 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. В одном из вариантов осуществления 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.

[00947] В одном из вариантов осуществления агонист 4-1BB содержит домены CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, имеющие последовательности, представленные в SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:16, и SEQ ID NO:17, соответственно, и их консервативные аминокислотные замены, и домены CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, имеющие последовательности, представленные в SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:19 и SEQ ID NO:20, соответственно, и их консервативные аминокислотные замены.

[00948] В одном из вариантов осуществления агонист 4-1BB представляет собой биоаналогичное агонисту 4-1BB моноклональное антитело, одобренное регулирующими органами по лекарственным средствам со ссылкой на утомилумаб. В одном из вариантов осуществления биоаналогичное моноклональное антитело включает антитело к 4-1BB, содержащее аминокислотную последовательность, обладающую по меньшей мере 97% идентичностью, например, 97%, 98%, 99% или 100% идентичностью, аминокислотной последовательности референтного лекарственного препарата или референтного биологического препарата, и содержащее одну или более посттрансляционных модификаций по сравнению с указанным референтным лекарственным препаратом или референтным биологическим препаратом, где указанный референтный лекарственный препарат или референтный биологический препарат представляет собой утомилумаб. В некоторых вариантах осуществления одна или более посттрансляционных модификаций выбраны из одной или более из следующих: гликозилирование, окисление, дезамидирование и усечение. В некоторых вариантах осуществления изобретения биоаналог представляет собой антитело-агонист 4-1BB, разрешенное или являющееся предметом заявки на разрешение, где указанное антитело-агонист 4-1BB представлено в составе, который отличается от составов референтного лекарственного препарата или референтного биологического препарата, где указанный референтный лекарственный препарат или референтный биологический препарат представляет собой утомилумаб.

Антитело-агонист 4-1BB может быть разрешено регулирующим органом по лекарственным средствам, таким как FDA в США и/или EMA в Европейском Союзе. В некоторых вариантах осуществления биоаналог представлен в виде композиции, которая дополнительно содержит одно или более вспомогательных веществ, причем одно или более вспомогательных веществ являются такими же или отличными от вспомогательных веществ, содержащихся в референтном лекарственном препарате или референтном биологическом препарате, где указанный референтный лекарственный препарат или референтный биологический препарат представляет собой утомилумаб. В некоторых вариантах осуществления биоаналог представлен в виде композиции, которая дополнительно содержит одно или более вспомогательных веществ, причем одно или более вспомогательных веществ являются такими же или отличными от вспомогательных веществ, содержащихся в референтном лекарственном препарате или референтном биологическом препарате, где указанный референтный лекарственный препарат или референтный биологический препарат представляет собой утомилумаб.

ТАБЛИЦА 7. Аминокислотные последовательности антител-агонистов 4-1BB, относящиеся к утомилумабу.

Идентификатор	**Последовательность (однобуквенные обозначения аминокислот)**
SEQ ID NO:11 тяжелая цепь для 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 для утомилумаба	SYELTQPPSV SVSPGQTASI TCSGDNIGDQ YAHWYQQKPG QSPVLVIYQD KNRPSGIPER 60 FSGSNSGNTA TLTISGTQAM DEADYYCATY TGFGSLAVFG GGTKLTVLGQ PKAAPSVTLF 120

	PPSSEELQAN KATLVCLISD FYPGAVTVAW KADSSPVKAG VETTTPSKQS NNKYAASSYL 180 SLTPEQWKSH RSYSCQVTHE GSTVEKTVAP TECS 214
SEQ ID NO:13 вариабельная область тяжелой цепи для утомилумаба	EVQLVQSGAE VKKPGESLRI SCKGSGYSFS TYWISWVRQM PGKGLEWMG KIYPGDSYTN 60 YSPSFQGQVT ISADKSISTA YLQWSSLKAS DTAMYYCARG YGIFDYWGQ GTLVTVSS 118
SEQ ID NO:14 вариабельная область легкой цепи для утомилумаба	SYELTQPPSV SVSPGQTASI TCSGDNIGDQ YAHWYQQKPG QSPVLVIYQD KNRPSGIPER 60 FSGSNSGNTA TLTISGTQAM DEADYYCATY TGFGSLAVFG GGTKLTVL 108
SEQ ID NO:15 CDR1 тяжелой цепи для утомилумаба	STYWIS 6
SEQ ID NO:16 CDR2 тяжелой цепи для утомилумаба	KIYPGDSYTN YSPSFQG 17
SEQ ID NO:17 CDR3 тяжелой цепи для утомилумаба	RGYGIFDY 8
SEQ ID NO:18 CDR1 легкой цепи для утомилумаба	SGDNIGDQYA H 11
SEQ ID NO:19 CDR2 легкой цепи для утомилумаба	QDKNRPS 7
SEQ ID NO:20	ATYTGFGSLA V 11

CDR3 легкой цепи для утомилумаба	

[00949] В предпочтительном варианте осуществления агонист 4-1BB представляет собой моноклональное антитело урелумаб, также известное как BMS-663513 и 20H4.9.h4a, или его фрагмент, производное, вариант или биоаналог. Урелумаб доступен от Bristol-Myers Squibb, Inc. и Creative Biolabs, Inc. Урелумаб представляет собой иммуноглобулин G4-каппа, *Homo sapiens* (полностью человеческое) моноклональное антитело к [*Homo sapiens* TNFRSF9 (член 9 надсемейства рецепторов фактора некроза опухоли, 4-1BB, Т-клеточный антиген ILA, CD137)]. Аминокислотные последовательности урелумаба представлены в таблице EE. Урелумаб содержит сайты N-гликозилирования в положениях 298 (и 298'’); внутрицепочечные дисульфидные мостики в тяжелой цепи в положениях 22-95 (V_H-V_L), 148-204 (C_H1-C_L), 262-322 (C_H2) и 368-426 (C_H3) (и в положениях 22'’-95'’, 148'’-204'’, 262'’-322'’ и 368'’-426'’); внутрицепочечные дисульфидные мостики в легкой цепи в положениях 23'-88' (V_H-V_L) и 136'-196' (C_H1-C_L) (и в положениях 23'’'-88'’' и 136'’'-196'’'); межцепочечные дисульфидные мостики между тяжелыми цепями в положениях 227-227'’ и 230-230'’; и межцепочечные дисульфидные мостики между тяжелой цепью и легкой цепью 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 в настоящий документ посредством ссылки. Доклинические и клинические характеристики урелумаба описаны в источнике Segal, *et al.*, *Clin. Cancer Res.* **2016,** *доступен по ссылке* http:/dx.doi.org/ 10.1158/1078-0432.CCR-16-1272. Текущие клинические исследования урелумаба при различных гематологических и солидных опухолях включают идентификаторы NCT01775631, NCT02110082, NCT02253992 и NCT01471210 на сайте Health clinicaltrials.gov Национального института здравоохранения США.

[00950] В одном из вариантов осуществления агонист 4-1BB содержит тяжелую цепь, представленную SEQ ID NO:21, и легкую цепь, представленную SEQ ID NO:22. В одном из вариантов осуществления агонист 4-1BB содержит тяжелую и легкую цепи, имеющие последовательности, представленные в SEQ ID NO:21 и SEQ ID NO:22, соответственно, или их антигенсвязывающие фрагменты, фрагменты Fab, одноцепочечные вариабельные фрагменты (scFv), варианты или конъюгаты. В одном из вариантов осуществления агонист 4-1BB содержит тяжелую и легкую цепи, каждая из которых по меньшей мере на 99% идентична последовательностям, представленным в SEQ ID NO:21 и SEQ ID NO:22, соответственно. В одном из вариантов осуществления агонист 4-1BB содержит тяжелую и легкую цепи, каждая из которых по меньшей мере на 98% идентична последовательностям, представленным в SEQ ID NO:21 и SEQ ID NO:22, соответственно. В одном из вариантов осуществления агонист 4-1BB содержит тяжелую и легкую цепи, каждая из которых по меньшей мере на 97% идентична последовательностям,

представленным в SEQ ID NO:21 и SEQ ID NO:22, соответственно. В одном из вариантов осуществления агонист 4-1BB содержит тяжелую и легкую цепи, каждая из которых по меньшей мере на 96% идентична последовательностям, представленным в SEQ ID NO:21 и SEQ ID NO:22, соответственно. В одном из вариантов осуществления агонист 4-1BB содержит тяжелую и легкую цепи, каждая из которых по меньшей мере на 95% идентична последовательностям, представленным в SEQ ID NO:21 и SEQ ID NO:22, соответственно.

[00951] В одном из вариантов осуществления агонист 4-1BB содержит CDR или вариабельные области (VR) тяжелой и легкой цепи урелумаба. В одном из вариантов осуществления вариабельная область тяжелой цепи (V_H) агониста 4-1BB содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO:23, а вариабельная область легкой цепи (V_L) агониста 4-1BB содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO:24, и их консервативные аминокислотные замены. В одном из вариантов осуществления 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. В одном из вариантов осуществления 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. В одном из вариантов осуществления 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. В одном из вариантов осуществления 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. В одном из вариантов осуществления 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. В одном из вариантов осуществления 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.

[00952] В одном из вариантов осуществления агонист 4-1BB содержит домены CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, имеющие последовательности, представленные в SEQ ID NO:25, SEQ ID NO:26 и SEQ ID NO:27, соответственно, и их консервативные аминокислотные замены, и домены CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, имеющие последовательности, представленные в SEQ ID NO:28, SEQ ID NO:29 и SEQ ID NO:30, соответственно, и их консервативные аминокислотные замены.

[00953] В одном из вариантов осуществления агонист 4-1BB представляет собой биоаналогичное агонисту 4-1BB моноклональное антитело, одобренное регулирующими органами по лекарственным средствам со ссылкой на урелумаб. В одном из вариантов осуществления биоаналогичное моноклональное антитело включает антитело к 4-1BB, содержащее аминокислотную последовательность, обладающую по меньшей мере 97% идентичностью, например, 97%, 98%, 99% или 100% идентичностью, аминокислотной последовательности референтного лекарственного препарата или референтного

биологического препарата, и содержащее одну или более посттрансляционных модификаций по сравнению с указанным референтным лекарственным препаратом или референтным биологическим препаратом, где указанный референтный лекарственный препарат или референтный биологический препарат представляет собой урелумаб. В некоторых вариантах осуществления одна или более посттрансляционных модификаций выбраны из одной или более из следующих: гликозилирование, окисление, дезамидирование и усечение. В некоторых вариантах осуществления изобретения биоаналог представляет собой антитело-агонист 4-1BB, разрешенное или являющееся предметом заявки на разрешение, где указанное антитело-агонист 4-1BB представлено в составе, который отличается от составов референтного лекарственного препарата или референтного биологического препарата, где указанный референтный лекарственный препарат или референтный биологический препарат представляет собой урелумаб. Антитело-агонист 4-1BB может быть разрешено регулирующим органом по лекарственным средствам, таким как FDA в США и/или EMA в Европейском Союзе. В некоторых вариантах осуществления биоаналог представлен в виде композиции, которая дополнительно содержит одно или более вспомогательных веществ, причем одно или более вспомогательных веществ являются такими же или отличными от вспомогательных веществ, содержащихся в референтном лекарственном препарате или референтном биологическом препарате, где указанный референтный лекарственный препарат или референтный биологический препарат представляет собой урелумаб. В некоторых вариантах осуществления биоаналог представлен в виде композиции, которая дополнительно содержит одно или более вспомогательных веществ, причем одно или более вспомогательных веществ являются такими же или отличными от вспомогательных веществ, содержащихся в референтном лекарственном препарате или референтном биологическом препарате, где указанный референтный лекарственный препарат или референтный биологический препарат представляет собой урелумаб.

ТАБЛИЦА 8: Аминокислотные последовательности антител-агонистов 4-1BB, относящиеся к урелумабу.

Идентификатор	**Последовательность (однобуквенные обозначения аминокислот)**
SEQ ID NO:21 тяжелая цепь для 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 для урелумаба	EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SYLAWYQQKP GQAPRLLIYD ASNRATGIPA 60 RFSGSGSGTD FTLTISSLEP EDFAVYYCQQ RSNWPPALTF CGGTKVEIKR TVAAPSVFIF 120 PPSDEQLKSG TASVVCLLNN FYPREAKVQW KVDNALQSGN SQESVTEQDS KDSTYSLSST 180 LTLSKADYEK HKVYACEVTH QGLSSPVTKS FNRGEC 216
SEQ ID NO:23 вариабельная область тяжелой цепи для урелумаба	MKHLWFFLLL VAAPRWVLSQ VQLQQWGAGL LKPSETLSLT CAVYGGSFSG YYWSWIRQSP 60 EKGLEWIGEI NHGGYVTYNP SLESRVTISV DTSKNQFSLK LSSVTAADTA VYYCARDYGP 120
SEQ ID NO:24 вариабельная область легкой цепи для урелумаба	MEAPAQLLFL LLLWLPDTTG EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SYLAWYQQKP 60 GQAPRLLIYD ASNRATGIPA RFSGSGSGTD FTLTISSLEP EDFAVYYCQQ 110
SEQ ID NO:25 CDR1 тяжелой цепи для урелумаба	GYYWS 5
SEQ ID NO:26 CDR2 тяжелой цепи для урелумаба	EINHGGYVTY NPSLES 16
SEQ ID NO:27 CDR3 тяжелой цепи для урелумаба	DYGPGNYDWY FDL 13

SEQ ID NO:28 CDR1 легкой цепи для урелумаба	RASQSVSSYL A 11
SEQ ID NO:29 CDR2 легкой цепи для урелумаба	DASNRAT 7
SEQ ID NO:30 CDR3 легкой цепи для урелумаба	QQRSDWPPAL T 11

[00954] В одном из вариантов осуществления 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, продуцированного линией клеток, депонированной под № ATCC HB-11248 и раскрытой в патенте США № 6974863, 5F4 (BioLegend 31 1503), C65-485 (BD Pharmingen 559446), антител, раскрытых в публикации заявки 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, раскрытых в патенте США № 5928893, антител, раскрытых в патенте США № 6303121, антител, раскрытых в патенте США № 6569997, антител, раскрытых в публикациях международных патентных заявок WO 2012/177788, WO 2015/119923 и WO 2010/042433, и их фрагментов, производных, конъюгатов, вариантов или биоаналогов, где содержание каждого из упомянутых выше патентов или публикаций патентных заявок включено в настоящий документ посредством ссылки.

[00955] В одном из вариантов осуществления агонист 4-1BB представляет собой слитый белок-агонист 4-1BB, описанный в публикациях международных патентных заявок WO 2008/025516 A1, WO 2009/007120 A1, WO 2010/003766 A1, WO 2010/010051 A1 и WO 2010/078966 A1; публикациях заявок 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 в настоящий документ посредством ссылки.

[00956] В одном из вариантов осуществления агонист 4-1BB представляет собой слитый белок-агонист 4-1BB, представленный структурой I-A (слитый белок С-концевого фрагмента Fc антитела) или структурой I-B (слитый белок N-концевого фрагмента Fc антитела), или их фрагмент, производное, конъюгат, вариант или биоаналог, как показано на фиг. 131.

[00957] В структурах I-A и I-B цилиндры относятся к отдельным связывающим доменам полипептидов. Структуры I-A и I-B содержат три линейно связанных связывающих TNFRSF домена, полученных, например, из 4-1BBL (лиганд 4-1BB, лиганд CD137 (CD137L) или член 9 надсемейства фактора некроза опухоли (TNFSF9) или антитела, связывающего 4-1BB, которые сворачиваются с образованием трехвалентного белка, который затем связывается со вторым трехвалентным белком через IgG1-Fc (включая домены C_H3 и C_H2), который используется для связывания вместе двух трехвалентных белков посредством дисульфидных связей (небольшие удлиненные овалы), что стабилизирует структуру и обеспечивает агонисты, способные объединять внутриклеточные сигнальные домены шести рецепторов и сигнальных белков с образованием сигнального комплекса. Связывающие TNFRSF домены, обозначенные цилиндрами, могут представлять собой домены scFv, содержащие, например, цепь VH и VL, соединенные линкером, который может содержать гидрофильные остатки и последовательности Gly и Ser для гибкости, а также Glu и Lys для растворимости. Может быть использована любая конструкция домена scFv, например, описанная 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 ссылках, включенных в настоящий документ в другом месте. Структуры слитых белков этой формы описаны в патентах США №№ 9359420, 9340599, 8921519 и 8450460, содержание которых включено в настоящий документ посредством ссылки.

[00958] Аминокислотные последовательности для других 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 соединения С-концевого Fc-антитела могут быть выбраны из вариантов осуществления, 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, включая слитые белки-агонисты 4-1BB, с конструкцией слитого белка С-концевого Fc-фрагмента антитела (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

[00959] Аминокислотные последовательности для других полипептидных доменов структуры I-B приведены в таблице 10. Если фрагмент Fc антитела слит с N-концом слитого белка-агониста TNRFSF, как в структуре I-B, последовательность модуля Fc предпочтительно представляет собой последовательность, представленную в SEQ ID NO:42, и линкерные последовательности предпочтительно выбраны из вариантов осуществления, представленных в SED ID NO:43 - SEQ ID NO:45.

ТАБЛИЦА 10: Аминокислотные последовательности для слитых белков-агонистов TNFRSF, включая слитые белки-агонисты 4-1BB, с конструкцией слитого белка N-концевого Fc-фрагмента 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

[00960] В одном из вариантов осуществления слитый белок-агонист 4-1BB, соответствующий структурам I-A или I-B, содержит один или более связывающих 4-1BB доменов, выбранных из группы, состоящей из вариабельной области тяжелой цепи и вариабельной области легкой цепи утомилумаба, вариабельной области тяжелой цепи и вариабельной области легкой цепи урелумаба, вариабельной области тяжелой цепи и вариабельной области легкой цепи утомилумаба, вариабельной области тяжелой цепи и вариабельной области легкой цепи, выбранных из вариабельных областей тяжелой цепи и вариабельных областей легкой цепи, описанных в таблице 10, любой комбинации вариабельной области тяжелой цепи и вариабельной области легкой цепи из вышеуказанных, а также их фрагментов, производных, конъюгатов, вариантов и биоаналогов.

[00961] В одном из вариантов осуществления слитый белок-агонист 4-1BB, соответствующий структурам I-A или I-B, содержит один или более связывающих 4-1BB доменов, содержащих последовательность 4-1BBL. В одном из вариантов осуществления слитый белок-агонист 4-1BB, соответствующий структурам I-A или I-B, содержит один или более связывающих 4-1BB доменов, содержащих последовательность согласно SEQ ID NO:46. В одном из вариантов осуществления слитый белок-агонист 4-1BB, соответствующий структурам I-A или I-B, содержит один или более связывающих 4-1BB доменов, содержащих последовательность растворимого 4-1BBL. В одном из вариантов осуществления слитый белок-агонист 4-1BB, соответствующий структурам I-A или I-B, содержит один или более связывающих 4-1BB доменов, содержащих последовательность

согласно SEQ ID NO:47.

[00962] В одном из вариантов осуществления слитый белок-агонист 4-1BB, соответствующий структурам 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, где домены V_H и V_L соединены линкером. В одном из вариантов осуществления слитый белок-агонист 4-1BB, соответствующий структурам 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, где домены V_H и V_L соединены линкером. В одном из вариантов осуществления слитый белок-агонист 4-1BB, соответствующий структурам 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, представленным в таблице 11, где домены V_H и V_L соединены линкером.

ТАБЛИЦА 11: Дополнительные полипептидные домены, подходящие 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 растворимый домен 4-1BBL	LRQGMFAQLV AQNVLLIDGP LSWYSDPGLA GVSLTGGLSY KEDTKELVVA KAGVYYYVFFQ 60 LELRRVVAGE GSGSVSLALH LQPLRSAAGA AALALTVDLP PASSEARNSA FGFQGRLLHL 120 SAGQRLGVHL HTEARARHAW QLTQGATVLG LFRVTPEIPA GLPSPRSE 168
SEQ ID NO:48 вариабельная	QVQLQQPGAE LVKPGASVKL SCKASGYTFS SYWMHWVKQR PGQVLEWIGE INPGNGHTNY 60

область тяжелой цепи для 4B4-1-1 версии 1	NEKFKSKATL TVDKSSSTAY MQLSSLTSED SAVYYCARSF TTARGFAYWG QGTLVTVS 118
SEQ ID NO:49 вариабельная область легкой цепи для 4B4-1-1 версии 1	DIVMTQSPAT QSVTPGDRVS LSCRASQTIS DYLHWYQQKS HESPRLLIKY ASQSISGIPS 60 RFSGSGSGSD FTLSINSVEP EDVGVYYCQD GHSFPPTFGG GTKLEIK 107
SEQ ID NO:50 вариабельная область тяжелой цепи для 4B4-1-1 версии 2	QVQLQQPGAE LVKPGASVKL SCKASGYTFS SYWMHWVKQR PGQVLEWIGE INPGNGHTNY 60 NEKFKSKATL TVDKSSSTAY MQLSSLTSED SAVYYCARSF TTARGFAYWG QGTLVTVSA 119
SEQ ID NO:51 вариабельная область легкой цепи для 4B4-1-1 версии 2	DIVMTQSPAT QSVTPGDRVS LSCRASQTIS DYLHWYQQKS HESPRLLIKY ASQSISGIPS 60 RFSGSGSGSD FTLSINSVEP EDVGVYYCQD GHSFPPTFGG GTKLEIKR 108
SEQ ID NO:52 вариабельная область тяжелой цепи для H39E3-2	MDWTWRILFL VAAATGAHSE VQLVESGGGL VQPGGSLRLS CAASGFTFSD YWMSWVRQAP 60 GKGLEWVADI KNDGSYTNYA PSLTNRFTIS RDNAKNSLYL QMNSLRAEDT AVYYCARELT 120
SEQ ID NO:53 вариабельная область легкой цепи для H39E3-2	MEAPAQLLFL LLLWLPDTTG DIVMTQSPDS LAVSLGERAT INCKSSQSLL SSGNQKNYL 60 WYQQKPGQPP KLLIYYASTR QSGVPDRFSG SGSGTDFTLT ISSLQAEDVA 110

[00963] В одном из вариантов осуществления агонист 4-1BB представляет собой одноцепочечный слитый полипептид-агонист 4-1BB, 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, и где дополнительный домен представляет собой домен фрагмента Fab или Fc. В одном из вариантов осуществления агонист 4-1BB представляет собой одноцепочечный слитый полипептид-агонист 4-1BB, 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, где дополнительный домен представляет собой домен фрагмента Fab или Fc, причем в каждом из растворимых доменов к 4-1BB отсутствует стеблевая область (которая способствует тримеризации и обеспечивает определенное расстояние до клеточной мембраны, но не является частью связывающего 4-1BB домена), и первый и второй пептидные линкеры независимо друг от друга имеют длину 3-8 аминокислот.

[00964] В одном из вариантов осуществления агонист 4-1BB представляет собой одноцепочечный слитый полипептид-агонист 4-1BB, содержащий (i) первый растворимый домен цитокина из надсемейства факторов некроза опухоли (TNF), (ii) первый пептидный линкер, (iii) второй растворимый домен цитокина из надсемейства TNF, (iv) второй пептидный линкер и (v) третий растворимый домен цитокина из надсемейства TNF, где в каждом из растворимых доменов цитокина из надсемейства TNF отсутствует стеблевая область, и первый и второй пептидные линкеры независимо друг от друга имеют длину 3-8 аминокислот, и где каждый домен цитокина из надсемейства TNF является связывающим 4-1BB доменом.

[00965] В одном из вариантов осуществления агонист 4-1BB представляет собой агонистическое scFv-антитело к 4-1BB, содержащее любой из вышеуказанных доменов V_H, связанный с любым из вышеуказанных доменов V_L.

[00966] В одном из вариантов осуществления агонист 4-1BB представляет собой антитело-агонист 4-1BB BPS Bioscience, № по каталогу 79097-2, коммерчески доступное от BPS Bioscience, Сан-Диего, Калифорния, США. В одном из вариантов осуществления агонист 4-1BB представляет собой антитело-агонист 4-1BB Creative Biolabs, № по каталогу MOM-18179, коммерчески доступное от Creative Biolabs, Ширли, Нью-Йорк, США.

3. Агонисты OX40 (CD134)

[00967] В одном из вариантов осуществления агонист TNFRSF представляет собой агонист OX40 (CD134). Агонист OX40 может представлять собой любую связывающую OX40 молекулу, известную в данной области техники. Связывающая OX40 молекула может представлять собой моноклональное антитело или слитый белок, способный связываться с OX40 человека или млекопитающего. 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 молекулы иммуноглобулина. Агонист OX40 или связывающая OX40 молекула может иметь как тяжелую, так и легкую цепь. В контексте настоящего документа термин «связывающая молекула» также включает антитела (включая полноразмерные антитела), моноклональные антитела (включая полноразмерные моноклональные антитела), поликлональные антитела, полиспецифические антитела (например, биспецифические антитела), человеческие, гуманизированные или химерные антитела и фрагменты антител, например, фрагменты Fab, фрагменты F(ab′), фрагменты, продуцируемые библиотекой экспрессии Fab, эпитоп-

связывающие фрагменты любого из вышеперечисленных и генетически сконструированные формы антител, например, молекулы scFv, которые связываются с OX40. В одном из вариантов осуществления агонист OX40 представляет собой антигенсвязывающий белок, который является полностью человеческим антителом. В одном из вариантов осуществления агонист OX40 представляет собой антигенсвязывающий белок, который является гуманизированным антителом. В некоторых вариантах осуществления агонисты OX40 для применения в раскрытых в настоящем документе способах и композициях включают антитела к OX40, антитела к OX40 человека, мышиные антитела к OX40, антитела млекопитающих к OX40, моноклональные антитела к OX40, поликлональные антитела к OX40, химерные антитела к OX40, аднектины к OX40, доменные антитела к OX40, одноцепочечные фрагменты к OX40, фрагменты тяжелой цепи к OX40, фрагменты легкой цепи к OX40, слитые белки к OX40 и их фрагменты, производные, конъюгаты, варианты или биоаналоги. В предпочтительном варианте осуществления агонист OX40 представляет собой агонистическое гуманизированное или полностью человеческое моноклональное антитело (т. е. антитело, полученное из одной клеточной линии) к OX40.

[00968] В предпочтительном варианте осуществления агонист OX40 или связывающая OX40 молекула также может представлять собой слитый белок. Слитые белки OX40, содержащие Fc-домен, слитый с OX40L, описаны, например, в источнике Sadun, *et al.*, *J. Immunother.* **2009,** *182,* 1481-89. В предпочтительном варианте осуществления мультимерный агонист OX40, такой как тримерный или гексамерный агонист OX40 (с тремя или шестью лиганд-связывающими доменами), может индуцировать более высокую кластеризацию рецептора (OX40L) и образование внутриклеточного сигнального комплекса по сравнению с агонистическим моноклональным антителом, которое обычно имеет два лиганд-связывающих домена. Тримерные (трехвалентные) или гексамерные (или шестивалентные), или имеющие более высокую валентность слитые белки, содержащие три связывающих TNFRSF домена и IgG1-Fc, и, необязательно, дополнительно связывающие два или более из этих слитых белков, описаны, например, в Gieffers, *et al.*, *Mol. Cancer Therapeutics* **2013,** *12,* 2735-47.

[00969] Известно, что агонистические антитела к OX40 и слитые белки вызывают сильные иммунные ответы. Curti, *et al.*, *Cancer Res.* **2013**, *73,* 7189-98. В предпочтительном варианте осуществления агонист OX40 представляет собой моноклональное антитело или слитый белок, который специфически связывается с антигеном OX40 способом, достаточным для снижения токсичности. В некоторых вариантах осуществления агонист OX40 представляет собой агонистическое моноклональное антитело к OX40 или слитый белок, который устраняет антителозависимую клеточную токсичность (АЗКЦ), например, цитотоксичность NK-клеток. В некоторых вариантах осуществления агонист OX40 представляет собой агонистическое моноклональное антитело к OX40 или слитый белок, который устраняет антителозависимый клеточный фагоцитоз (АЗКФ). В некоторых вариантах осуществления агонист OX40 представляет собой агонистическое

моноклональное антитело к OX40 или слитый белок, который устраняет комплемент-зависимую цитотоксичность (КЗЦ). В некоторых вариантах осуществления агонист OX40 представляет собой агонистическое моноклональное антитело к OX40 или слитый белок, который устраняет функциональность области Fc.

[00970] В некоторых вариантах осуществления агонисты OX40 характеризуются связыванием с OX40 человека (SEQ ID NO:54) с высокой аффинностью и агонистической активностью. В одном из вариантов осуществления агонист OX40 представляет собой связывающую молекулу, которая связывается с OX40 человека (SEQ ID NO:54). В одном из вариантов осуществления агонист OX40 представляет собой связывающую молекулу, которая связывается с мышиным OX40 (SEQ ID NO:55). Аминокислотные последовательности антигена OX40, с которым связывается агонист OX40 или связывающая OX40 молекула, обобщены в таблице 12.

ТАБЛИЦА 12: Аминокислотные последовательности 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 мышиный OX40 (Mus musculus)	MYVWVQQPTA LLLLGLTLGV TARRLNCVKH TYPSGHKCCR ECQPGHGMVS RCDHTRDTLC 60 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

[00971] В некоторых вариантах осуществления описанные композиции, процессы и способы включают агонист OX40, который связывает человеческий или мышиный OX40 с K_D приблизительно 100 пМ или ниже, связывает человеческий или мышиный OX40 с K_D приблизительно 90 пМ или ниже, связывает человеческий или мышиный OX40 с K_D

приблизительно 80 пМ или ниже, связывает человеческий или мышиный OX40 с K_D приблизительно 70 пМ или ниже, связывает человеческий или мышиный OX40 с K_D приблизительно 60 пМ или ниже, связывает человеческий или мышиный OX40 с K_D приблизительно 50 пМ или ниже, связывает человеческий или мышиный OX40 с K_D приблизительно 40 пМ или ниже, или связывает человеческий или мышиный OX40 с K_D приблизительно 30 пМ или ниже.

[00972] В некоторых вариантах осуществления описанные композиции, процессы и способы включают агонист OX40, который связывается с человеческим или мышиным OX40 с k_{assoc} приблизительно $7,5 \times 10^5$ 1/М·с или быстрее, связывается с человеческим или мышиным OX40 с k_{assoc} приблизительно $7,5 \times 10^5$ 1/М·с или быстрее, связывается с человеческим или мышиным OX40 с k_{assoc} приблизительно 8×10^5 1/М·с или быстрее, связывается с человеческим или мышиным OX40 с k_{assoc} приблизительно $8,5 \times 10^5$ 1/М·с или быстрее, связывается с человеческим или мышиным OX40 с k_{assoc} приблизительно 9×10^5 1/М·с или быстрее, связывается с человеческим или мышиным OX40 с k_{assoc} приблизительно $9,5 \times 10^5$ 1/М·с или быстрее, или связывается с человеческим или мышиным OX40 с k_{assoc} приблизительно 1×10^6 1/М·с или быстрее.

[00973] В некоторых вариантах осуществления описанные композиции, процессы и способы включают агонист OX40, который связывается с человеческим или мышиным OX40 с k_{dissoc} приблизительно 2×10^{-5} 1/с или медленнее, связывается с человеческим или мышиным OX40 с k_{dissoc} приблизительно $2,1 \times 10^{-5}$ 1/с или медленнее, связывается с человеческим или мышиным OX40 с k_{dissoc} приблизительно $2,2 \times 10^{-5}$ 1/с или медленнее, связывается с человеческим или мышиным OX40 с k_{dissoc} приблизительно $2,3 \times 10^{-5}$ 1/с или медленнее, связывается с человеческим или мышиным OX40 с k_{dissoc} приблизительно $2,4 \times 10^{-5}$ 1/с или медленнее, связывается с человеческим или мышиным OX40 с k_{dissoc} приблизительно $2,5 \times 10^{-5}$ 1/с или медленнее, связывается с человеческим или мышиным OX40 с k_{dissoc} приблизительно $2,6 \times 10^{-5}$ 1/с или медленнее, или связывается с человеческим или мышиным OX40 с k_{dissoc} приблизительно $2,7 \times 10^{-5}$ 1/с или медленнее, связывается с человеческим или мышиным OX40 с k_{dissoc} приблизительно $2,8 \times 10^{-5}$ 1/с или медленнее, связывается с человеческим или мышиным OX40 с k_{dissoc} приблизительно $2,9 \times 10^{-5}$ 1/с или медленнее, или связывается с человеческим или мышиным OX40 с k_{dissoc} приблизительно 3×10^{-5} 1/с или медленнее.

[00974] В некоторых вариантах осуществления описанные композиции, процессы и способы включают агонист OX40, который связывается с человеческим или мышиным OX40 с IC_{50} приблизительно 10 нМ или ниже, связывается с человеческим или мышиным OX40 с IC_{50} приблизительно 9 нМ или ниже, связывается с человеческим или мышиным OX40 с IC_{50} приблизительно 8 нМ или ниже, связывается с человеческим или мышиным OX40 с IC_{50} приблизительно 7 нМ или ниже, связывается с человеческим или мышиным OX40 с IC_{50} приблизительно 6 нМ или ниже, связывается с человеческим или мышиным OX40 с IC_{50} приблизительно 5 нМ или ниже, связывается с человеческим или мышиным OX40 с IC_{50} приблизительно 4 нМ или ниже, связывается с человеческим или мышиным

OX40 с IC_{50} приблизительно 3 нМ или ниже, связывается с человеческим или мышиным OX40 с IC_{50} приблизительно 2 нМ или ниже, или связывается с человеческим или мышиным OX40 с IC_{50} приблизительно 1 нМ или ниже.

[00975] В некоторых вариантах осуществления агонист OX40 представляет собой таволиксизумаб, также известный как MEDI0562 или MEDI-0562. Таволиксизумаб доступен от MedImmune - дочерней компании AstraZeneca, Inc. Таволиксизумаб представляет собой иммуноглобулин G1-каппа, гуманизированное и химерное антитело к [*Homo sapiens* TNFRSF4 (член 4 надсемейства рецепторов фактора некроза опухоли (TNFR), OX40, CD134)]. Аминокислотные последовательности таволиксизумаба представлены в таблице 13. Таволиксизумаб содержит сайты N-гликозилирования в положениях 301 и 301'', с фукозилированными комплексными биантенными гликанами типа CHO; внутрицепочечные дисульфидные мостики в тяжелой цепи в положениях 22-95 (V_H-V_L), 148-204 (C_H1-C_L), 265-325 (C_H2) и 371-429 (C_H3) (и в положениях 22''-95'', 148''-204'', 265''-325'' и 371''-429''); внутрицепочечные дисульфидные мостики в легкой цепи в положениях 23'-88' (V_H-V_L) и 134'-194' (C_H1-C_L) (и в положениях 23'''-88''' и 134'''-194'''); межцепочечные дисульфидные мостики между тяжелыми цепями в положениях 230-230'' и 233-233''; и межцепочечные дисульфидные мостики между тяжелой цепью и легкой цепью в положениях 224-214' и 224''-214'''. Текущие клинические исследования таволиксизумаба при различных солидных опухолях включают идентификаторы NCT02318394 и NCT02705482 на сайте Health clinicaltrials.gov Национального института здравоохранения США.

[00976] В одном из вариантов осуществления агонист OX40 содержит тяжелую цепь, представленную SEQ ID NO:56, и легкую цепь, представленную SEQ ID NO:57. В одном из вариантов осуществления агонист OX40 содержит тяжелую и легкую цепи, имеющие последовательности, представленные в SEQ ID NO:56 и SEQ ID NO:57, соответственно, или их антигенсвязывающие фрагменты, фрагменты Fab, одноцепочечные вариабельные фрагменты (scFv), варианты или конъюгаты. В одном из вариантов осуществления агонист OX40 содержит тяжелую и легкую цепи, каждая из которых по меньшей мере на 99% идентична последовательностям, представленным в SEQ ID NO:56 и SEQ ID NO:57, соответственно. В одном из вариантов осуществления агонист OX40 содержит тяжелую и легкую цепи, каждая из которых по меньшей мере на 98% идентична последовательностям, представленным в SEQ ID NO:56 и SEQ ID NO:57, соответственно. В одном из вариантов осуществления агонист OX40 содержит тяжелую и легкую цепи, каждая из которых по меньшей мере на 97% идентична последовательностям, представленным в SEQ ID NO:56 и SEQ ID NO:57, соответственно. В одном из вариантов осуществления агонист OX40 содержит тяжелую и легкую цепи, каждая из которых по меньшей мере на 96% идентична последовательностям, представленным в SEQ ID NO:56 и SEQ ID NO:57, соответственно. В одном из вариантов осуществления агонист OX40 содержит тяжелую и легкую цепи, каждая из которых по меньшей мере на 95% идентична последовательностям, представленным в SEQ ID NO:56 и SEQ ID NO:57, соответственно.

[00977] В одном из вариантов осуществления агонист OX40 содержит CDR или вариабельные области (VR) тяжелой и легкой цепи таволиксизумаба. В одном из вариантов осуществления вариабельная область тяжелой цепи (V_H) агониста OX40 содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO:58, а вариабельная область легкой цепи (V_L) агониста OX40 содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO:59, и их консервативные аминокислотные замены. В одном из вариантов осуществления 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. В одном из вариантов осуществления 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. В одном из вариантов осуществления 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. В одном из вариантов осуществления 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. В одном из вариантов осуществления 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. В одном из вариантов осуществления 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.

[00978] В одном из вариантов осуществления агонист OX40 содержит домены CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, имеющие последовательности, представленные в SEQ ID NO:60, SEQ ID NO:61 и SEQ ID NO:62, соответственно, и их консервативные аминокислотные замены, и домены CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, имеющие последовательности, представленные в SEQ ID NO:63, SEQ ID NO:64 и SEQ ID NO:65, соответственно, и их консервативные аминокислотные замены.

[00979] В одном из вариантов осуществления агонист OX40 представляет собой биоаналогичное агонисту OX40 моноклональное антитело, одобренное регулирующими органами по лекарственным средствам со ссылкой на таволиксизумаб. В одном из вариантов осуществления биоаналогичное моноклональное антитело включает антитело к OX40, содержащее аминокислотную последовательность, обладающую по меньшей мере 97% идентичностью, например, 97%, 98%, 99% или 100% идентичностью, аминокислотной последовательности референтного лекарственного препарата или референтного биологического препарата, и содержащее одну или более посттрансляционных модификаций по сравнению с указанным референтным лекарственным препаратом или референтным биологическим препаратом, где указанный референтный лекарственный препарат или референтный биологический препарат представляет собой таволиксизумаб. В некоторых вариантах осуществления одна или более посттрансляционных модификаций выбраны из одной или более из следующих: гликозилирование, окисление,

дезамидирование и усечение. В некоторых вариантах осуществления изобретения биоаналог представляет собой антитело-агонист OX40, разрешенное или являющееся предметом заявки на разрешение, где указанное антитело-агонист OX40 представлено в составе, который отличается от составов референтного лекарственного препарата или референтного биологического препарата, где указанный референтный лекарственный препарат или референтный биологический препарат представляет собой таволиксизумаб. Антитело-агонист OX40 может быть разрешено регулирующим органом по лекарственным средствам, таким как FDA в США и/или EMA в Европейском Союзе. В некоторых вариантах осуществления биоаналог представлен в виде композиции, которая дополнительно содержит одно или более вспомогательных веществ, причем одно или более вспомогательных веществ являются такими же или отличными от вспомогательных веществ, содержащихся в референтном лекарственном препарате или референтном биологическом препарате, где указанный референтный лекарственный препарат или референтный биологический препарат представляет собой таволиксизумаб. В некоторых вариантах осуществления биоаналог представлен в виде композиции, которая дополнительно содержит одно или более вспомогательных веществ, причем одно или более вспомогательных веществ являются такими же или отличными от вспомогательных веществ, содержащихся в референтном лекарственном препарате или референтном биологическом препарате, где указанный референтный лекарственный препарат или референтный биологический препарат представляет собой таволиксизумаб.

ТАБЛИЦА 13: Аминокислотные последовательности для антител-агонистов OX40, относящиеся к таволиксизумабу.

Идентификатор	**Последовательность (однобуквенные обозначения аминокислот)**
SEQ ID NO:56 тяжелая цепь для 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 для 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 для таволиксизумаба	QVQLQESGPG LVKPSQTLSL TCAVYGGSFS SGYWNWIRKH PGKGLEYIGY ISYNGITYHN 60 PSLKSRITIN RDTSKNQYSL QLNSVTPEDT AVYYCARYKY DYDGGHAMDY WGQGTLVT 118
SEQ ID NO:59 вариабельная область легкой цепи для таволиксизумаба	DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQDIS NYLNWYQQKP GKAPKLLIYY TSKLHSGVPS 60 RFSGSGSGTD YTLTISSLQP EDFATYYCQQ GSALPWTFGQ GTKVEIKR 108
SEQ ID NO:60 CDR1 тяжелой цепи для таволиксизумаба	GSFSSGYWN 9
SEQ ID NO:61 CDR2 тяжелой цепи для таволиксизумаба	YIGYISYNGI TYH 13
SEQ ID NO:62 CDR3 тяжелой цепи для таволиксизумаба	RYKYDYDGGH AMDY 14
SEQ ID NO:63 CDR1 легкой цепи для таволиксизумаба	QDISNYLN 8

SEQ ID NO:64 CDR2 легкой цепи для таволиксизумаба	LLIYYTSKLH S 11
SEQ ID NO:65 CDR3 легкой цепи для таволиксизумаба	QQGSALPW 8

[00980] В некоторых вариантах осуществления агонист OX40 представляет собой 11D4, которое представляет собой полностью человеческое антитело, доступное от Pfizer, Inc. Получение и свойства 11D4 описаны в патентах США №№ 7960515, 8236930 и 9028824, содержание которых включено в настоящий документ посредством ссылки. Аминокислотные последовательности 11D4 представлены в таблице 14.

[00981] В одном из вариантов осуществления агонист OX40 содержит тяжелую цепь, представленную SEQ ID NO:66, и легкую цепь, представленную SEQ ID NO:67. В одном из вариантов осуществления агонист OX40 содержит тяжелую и легкую цепи, имеющие последовательности, представленные в SEQ ID NO:66 и SEQ ID NO:67, соответственно, или их антигенсвязывающие фрагменты, фрагменты Fab, одноцепочечные вариабельные фрагменты (scFv), варианты или конъюгаты. В одном из вариантов осуществления агонист OX40 содержит тяжелую и легкую цепи, каждая из которых по меньшей мере на 99% идентична последовательностям, представленным в SEQ ID NO:66 и SEQ ID NO:67, соответственно. В одном из вариантов осуществления агонист OX40 содержит тяжелую и легкую цепи, каждая из которых по меньшей мере на 98% идентична последовательностям, представленным в SEQ ID NO:66 и SEQ ID NO:67, соответственно. В одном из вариантов осуществления агонист OX40 содержит тяжелую и легкую цепи, каждая из которых по меньшей мере на 97% идентична последовательностям, представленным в SEQ ID NO:66 и SEQ ID NO:67, соответственно. В одном из вариантов осуществления агонист OX40 содержит тяжелую и легкую цепи, каждая из которых по меньшей мере на 96% идентична последовательностям, представленным в SEQ ID NO:66 и SEQ ID NO:67, соответственно. В одном из вариантов осуществления агонист OX40 содержит тяжелую и легкую цепи, каждая из которых по меньшей мере на 95% идентична последовательностям, представленным в SEQ ID NO:66 и SEQ ID NO:67, соответственно.

[00982] В одном из вариантов осуществления агонист OX40 содержит CDR или вариабельные области (VR) тяжелой и легкой цепи 11D4. В одном из вариантов осуществления вариабельная область тяжелой цепи (V_H) агониста OX40 содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO:68, а вариабельная область легкой цепи (V_L) агониста OX40 содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO:69, и их консервативные аминокислотные замены. В одном из вариантов осуществления 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. В одном из вариантов осуществления 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. В одном из вариантов осуществления 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. В одном из вариантов осуществления 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. В одном из вариантов осуществления 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.

[00983] В одном из вариантов осуществления агонист OX40 содержит домены CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, имеющие последовательности, представленные в SEQ ID NO:70, SEQ ID NO:71 и SEQ ID NO:72, соответственно, и их консервативные аминокислотные замены, и домены CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, имеющие последовательности, представленные в SEQ ID NO:73, SEQ ID NO:74 и SEQ ID NO:75, соответственно, и их консервативные аминокислотные замены.

[00984] В одном из вариантов осуществления агонист OX40 представляет собой биоаналогичное агонисту OX40 моноклональное антитело, одобренное регулирующими органами по лекарственным средствам со ссылкой на 11D4. В одном из вариантов осуществления биоаналогичное моноклональное антитело включает антитело к OX40, содержащее аминокислотную последовательность, обладающую по меньшей мере 97% идентичностью, например, 97%, 98%, 99% или 100% идентичностью, аминокислотной последовательности референтного лекарственного препарата или референтного биологического препарата, и содержащее одну или более посттрансляционных модификаций по сравнению с указанным референтным лекарственным препаратом или референтным биологическим препаратом, где указанный референтный лекарственный препарат или референтный биологический препарат представляет собой 11D4. В некоторых вариантах осуществления одна или более посттрансляционных модификаций выбраны из одной или более из следующих: гликозилирование, окисление, дезамидирование и усечение. В некоторых вариантах осуществления изобретения биоаналог представляет собой антитело-агонист OX40, разрешенное или являющееся предметом заявки на разрешение, где указанное антитело-агонист OX40 представлено в составе, который отличается от составов референтного лекарственного препарата или референтного биологического препарата, где указанный референтный лекарственный препарат или референтный биологический препарат представляет собой 11D4. Антитело-агонист OX40 может быть разрешено регулирующим органом по лекарственным средствам, таким как FDA в США и/или EMA в Европейском Союзе. В некоторых вариантах осуществления биоаналог представлен в виде композиции, которая дополнительно содержит одно или более вспомогательных веществ, причем одно или более вспомогательных веществ

являются такими же или отличными от вспомогательных веществ, содержащихся в референтном лекарственном препарате или референтном биологическом препарате, где указанный референтный лекарственный препарат или референтный биологический препарат представляет собой 11D4. В некоторых вариантах осуществления биоаналог представлен в виде композиции, которая дополнительно содержит одно или более вспомогательных веществ, причем одно или более вспомогательных веществ являются такими же или отличными от вспомогательных веществ, содержащихся в референтном лекарственном препарате или референтном биологическом препарате, где указанный референтный лекарственный препарат или референтный биологический препарат представляет собой 11D4.

ТАБЛИЦА 14: Аминокислотные последовательности для антител-агонистов OX40, относящиеся к 11D4.

Идентификатор	**Последовательность (однобуквенные обозначения аминокислот)**
SEQ ID NO:66 тяжелая цепь для 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 для 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	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS SYSMNWVRQA

вариабельная область тяжелой цепи для 11D4	PGKGLEWVSY ISSSSSTIDY 60 ADSVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRDED TAVYYCARES GWYLFDYWGQ GTLVTVSS 118
SEQ ID NO:69 вариабельная область легкой цепи для 11D4	DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQGIS SWLAWYQQKP EKAPKSLIYA ASSLQSGVPS 60 RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ YNSYPPTFGG GTKVEIK 107
SEQ ID NO:70 CDR1 тяжелой цепи для 11D4	SYSMN 5
SEQ ID NO:71 CDR2 тяжелой цепи для 11D4	YISSSSSTID YADSVKG 17
SEQ ID NO:72 CDR3 тяжелой цепи для 11D4	ESGWYLFDY 9
SEQ ID NO:73 CDR1 легкой цепи для 11D4	RASQGISSWL A 11
SEQ ID NO:74 CDR2 легкой цепи для 11D4	AASSLQS 7
SEQ ID NO:75 CDR3 легкой цепи для 11D4	QQYNSYPPT 9

[00985] В некоторых вариантах осуществления агонист OX40 представляет собой 18D8, которое представляет собой полностью человеческое антитело, доступное от Pfizer, Inc. Получение и свойства 18D8 описаны в патентах США №№ 7960515, 8236930 и 9028824, содержание которых включено в настоящий документ посредством ссылки. Аминокислотные последовательности 18D8 представлены в таблице 15.

[00986] В одном из вариантов осуществления агонист OX40 содержит тяжелую цепь, представленную SEQ ID NO: 76, и легкую цепь, представленную SEQ ID NO: 77. В одном из вариантов осуществления агонист OX40 содержит тяжелую и легкую цепи, имеющие последовательности, представленные в SEQ ID NO:76 и SEQ ID NO:77, соответственно, или их антигенсвязывающие фрагменты, фрагменты Fab, одноцепочечные вариабельные фрагменты (scFv), варианты или конъюгаты. В одном из вариантов осуществления агонист

OX40 содержит тяжелую и легкую цепи, каждая из которых по меньшей мере на 99% идентична последовательностям, представленным в SEQ ID NO:76 и SEQ ID NO:77, соответственно. В одном из вариантов осуществления агонист OX40 содержит тяжелую и легкую цепи, каждая из которых по меньшей мере на 98% идентична последовательностям, представленным в SEQ ID NO:76 и SEQ ID NO:77, соответственно. В одном из вариантов осуществления агонист OX40 содержит тяжелую и легкую цепи, каждая из которых по меньшей мере на 97% идентична последовательностям, представленным в SEQ ID NO:76 и SEQ ID NO:77, соответственно. В одном из вариантов осуществления агонист OX40 содержит тяжелую и легкую цепи, каждая из которых по меньшей мере на 96% идентична последовательностям, представленным в SEQ ID NO:76 и SEQ ID NO:77, соответственно. В одном из вариантов осуществления агонист OX40 содержит тяжелую и легкую цепи, каждая из которых по меньшей мере на 95% идентична последовательностям, представленным в SEQ ID NO:76 и SEQ ID NO:77, соответственно.

[00987] В одном из вариантов осуществления агонист OX40 содержит CDR или вариабельные области (VR) тяжелой и легкой цепи 18D8. В одном из вариантов осуществления вариабельная область тяжелой цепи (V_H) агониста OX40 содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO:78, а вариабельная область легкой цепи (V_L) агониста OX40 содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO:79, и их консервативные аминокислотные замены. В одном из вариантов осуществления 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. В одном из вариантов осуществления 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. В одном из вариантов осуществления 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. В одном из вариантов осуществления 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. В одном из вариантов осуществления 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.

[00988] В одном из вариантов осуществления агонист OX40 содержит домены CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, имеющие последовательности, представленные в SEQ ID NO:80, SEQ ID NO:81 и SEQ ID NO:82, соответственно, и их консервативные аминокислотные замены, и домены CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, имеющие последовательности, представленные в SEQ ID NO:83, SEQ ID NO:84 и SEQ ID NO:85, соответственно, и их консервативные аминокислотные замены.

[00989] В одном из вариантов осуществления агонист OX40 представляет собой биоаналогичное агонисту OX40 моноклональное антитело, одобренное регулирующими органами по лекарственным средствам со ссылкой на 18D8. В одном из вариантов

осуществления биоаналогичное моноклональное антитело включает антитело к OX40, содержащее аминокислотную последовательность, обладающую по меньшей мере 97% идентичностью, например, 97%, 98%, 99% или 100% идентичностью, аминокислотной последовательности референтного лекарственного препарата или референтного биологического препарата, и содержащее одну или более посттрансляционных модификаций по сравнению с указанным референтным лекарственным препаратом или референтным биологическим препаратом, где указанный референтный лекарственный препарат или референтный биологический препарат представляет собой 18D8. В некоторых вариантах осуществления одна или более посттрансляционных модификаций выбраны из одной или более из следующих: гликозилирование, окисление, дезамидирование и усечение. В некоторых вариантах осуществления изобретения биоаналог представляет собой антитело-агонист OX40, разрешенное или являющееся предметом заявки на разрешение, где указанное антитело-агонист OX40 представлено в составе, который отличается от составов референтного лекарственного препарата или референтного биологического препарата, где указанный референтный лекарственный препарат или референтный биологический препарат представляет собой 18D8. Антитело-агонист OX40 может быть разрешено регулирующим органом по лекарственным средствам, таким как FDA в США и/или EMA в Европейском Союзе. В некоторых вариантах осуществления биоаналог представлен в виде композиции, которая дополнительно содержит одно или более вспомогательных веществ, причем одно или более вспомогательных веществ являются такими же или отличными от вспомогательных веществ, содержащихся в референтном лекарственном препарате или референтном биологическом препарате, где указанный референтный лекарственный препарат или референтный биологический препарат представляет собой 18D8. В некоторых вариантах осуществления биоаналог представлен в виде композиции, которая дополнительно содержит одно или более вспомогательных веществ, причем одно или более вспомогательных веществ являются такими же или отличными от вспомогательных веществ, содержащихся в референтном лекарственном препарате или референтном биологическом препарате, где указанный референтный лекарственный препарат или референтный биологический препарат представляет собой 18D8.

ТАБЛИЦА 15: Аминокислотные последовательности для антител-агонистов OX40, относящиеся к 18D8.

Идентификатор	**Последовательность (однобуквенные обозначения аминокислот)**
SEQ ID NO:76 тяжелая цепь для 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 для 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 для 18D8	EVQLVESGGG LVQPGRSLRL SCAASGFTFD DYAMHWVRQA PGKGLEWVSG ISWNSGSIGY 60 ADSVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TALYYCAKDQ STADYYFYYG MDVWGQGTTV 120 TVSS 124
SEQ ID NO:79 вариабельная область легкой цепи для 18D8	EIVVTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SYLAWYQQKP GQAPRLLIYD ASNRATGIPA 60 RFSGSGSGTD FTLTISSLEP EDFAVYYCQQ RSNWPTFGQG TKVEIK 106
SEQ ID NO:80 CDR1 тяжелой цепи для 18D8	DYAMH 5
SEQ ID NO:81 CDR2 тяжелой цепи для 18D8	GISWNSGSIG YADSVKG 17
SEQ ID NO:82 CDR3 тяжелой цепи для 18D8	DQSTADYYFY YGMDV 15

SEQ ID NO:83 CDR1 легкой цепи для 18D8	RASQSVSSYL A 11
SEQ ID NO:84 CDR2 легкой цепи для 18D8	DASNRAT 7
SEQ ID NO:85 CDR3 легкой цепи для 18D8	QQRSNWPT 8

[00990] В некоторых вариантах осуществления агонист OX40 представляет собой Hu119-122, которое представляет собой гуманизированное антитело, доступное от GlaxoSmithKline plc. Получение и свойства Hu119-122 описаны в патентах США №№ 9006399 и 9163085 и в публикации международной патентной заявки WO 2012/027328, содержание которых включено в настоящий документ посредством ссылки. Аминокислотные последовательности Hu119-122 представлены в таблице 16.

[00991] В одном из вариантов осуществления агонист OX40 содержит CDR или вариабельные области (VR) тяжелой и легкой цепи Hu119-122. В одном из вариантов осуществления вариабельная область тяжелой цепи (V_H) агониста OX40 содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO:86, а вариабельная область легкой цепи (V_L) агониста OX40 содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO:87, и их консервативные аминокислотные замены. В одном из вариантов осуществления 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. В одном из вариантов осуществления 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. В одном из вариантов осуществления 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. В одном из вариантов осуществления 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. В одном из вариантов осуществления 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.

[00992] В одном из вариантов осуществления агонист OX40 содержит домены CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, имеющие последовательности, представленные в SEQ ID NO:88, SEQ ID NO:89 и SEQ ID NO:90, соответственно, и их консервативные аминокислотные замены, и домены CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, имеющие последовательности, представленные в SEQ ID NO:91, SEQ ID NO:92 и SEQ ID NO:93, соответственно, и их консервативные аминокислотные замены.

[00993] В одном из вариантов осуществления агонист OX40 представляет собой биоаналогичное агонисту OX40 моноклональное антитело, одобренное регулирующими органами по лекарственным средствам со ссылкой на Hu119-122. В одном из вариантов осуществления биоаналогичное моноклональное антитело включает антитело к OX40, содержащее аминокислотную последовательность, обладающую по меньшей мере 97% идентичностью, например, 97%, 98%, 99% или 100% идентичностью, аминокислотной последовательности референтного лекарственного препарата или референтного биологического препарата, и содержащее одну или более посттрансляционных модификаций по сравнению с указанным референтным лекарственным препаратом или референтным биологическим препаратом, где указанный референтный лекарственный препарат или референтный биологический препарат представляет собой Hu119-122. В некоторых вариантах осуществления одна или более посттрансляционных модификаций выбраны из одной или более из следующих: гликозилирование, окисление, дезамидирование и усечение. В некоторых вариантах осуществления изобретения биоаналог представляет собой антитело-агонист OX40, разрешенное или являющееся предметом заявки на разрешение, где указанное антитело-агонист OX40 представлено в составе, который отличается от составов референтного лекарственного препарата или референтного биологического препарата, где указанный референтный лекарственный препарат или референтный биологический препарат представляет собой Hu119-122. Антитело-агонист OX40 может быть разрешено регулирующим органом по лекарственным средствам, таким как FDA в США и/или EMA в Европейском Союзе. В некоторых вариантах осуществления биоаналог представлен в виде композиции, которая дополнительно содержит одно или более вспомогательных веществ, причем одно или более вспомогательных веществ являются такими же или отличными от вспомогательных веществ, содержащихся в референтном лекарственном препарате или референтном биологическом препарате, где указанный референтный лекарственный препарат или референтный биологический препарат представляет собой Hu119-122. В некоторых вариантах осуществления биоаналог представлен в виде композиции, которая дополнительно содержит одно или более вспомогательных веществ, причем одно или более вспомогательных веществ являются такими же или отличными от вспомогательных веществ, содержащихся в референтном лекарственном препарате или референтном биологическом препарате, где указанный референтный лекарственный препарат или референтный биологический препарат представляет собой Hu119-122.

ТАБЛИЦА 16: Аминокислотные последовательности для антител-агонистов OX40, относящиеся к Hu119-122.

Идентификатор	**Последовательность (однобуквенные обозначения аминокислот)**
SEQ ID NO:86 вариабельная область тяжелой	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASEYEFP SHDMSWVRQA PGKGLELVAA INSDGGSTYY 60 PDTMERRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TAVYYCARHY

цепи для Hu119-122	DDYYAWFAYW GQGTMVTVSS 120
SEQ ID NO:87 вариабельная область легкой цепи для Hu119-122	EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASKSVS TSGYSYMHWY QQKPGQAPRL LIYLASNLES 60 GVPARFSGSG SGTDFTLTIS SLEPEDFAVY YCQHSRELPL TFGGGTKVEI K 111
SEQ ID NO:88 CDR1 тяжелой цепи для Hu119-122	SHDMS 5
SEQ ID NO:89 CDR2 тяжелой цепи для Hu119-122	AINSDGGSTY YPDTMER 17
SEQ ID NO:90 CDR3 тяжелой цепи для Hu119-122	HYDDYYAWFA Y 11
SEQ ID NO:91 CDR1 легкой цепи для Hu119-122	RASKSVSTSG YSYMH 15
SEQ ID NO:92 CDR2 легкой цепи для Hu119-122	LASNLES 7
SEQ ID NO:93 CDR3 легкой цепи для Hu119-122	QHSRELPLT 9

[00994] В некоторых вариантах осуществления агонист OX40 представляет собой Hu106-222, которое представляет собой гуманизированное антитело, доступное от GlaxoSmithKline plc. Получение и свойства Hu106-222 описаны в патентах США №№ 9006399 и 9163085 и в публикации международной патентной заявки WO 2012/027328,

содержание которых включено в настоящий документ посредством ссылки. Аминокислотные последовательности Hu106-222 представлены в таблице 17.

[00995] В одном из вариантов осуществления агонист OX40 содержит CDR или вариабельные области (VR) тяжелой и легкой цепи Hu106-222. В одном из вариантов осуществления вариабельная область тяжелой цепи (V_H) агониста OX40 содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO:94, а вариабельная область легкой цепи (V_L) агониста OX40 содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO:95, и их консервативные аминокислотные замены. В одном из вариантов осуществления 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. В одном из вариантов осуществления 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. В одном из вариантов осуществления 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. В одном из вариантов осуществления 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. В одном из вариантов осуществления 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.

[00996] В одном из вариантов осуществления агонист OX40 содержит домены CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, имеющие последовательности, представленные в SEQ ID NO:96, SEQ ID NO:97 и SEQ ID NO:98, соответственно, и их консервативные аминокислотные замены, и домены CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, имеющие последовательности, представленные в SEQ ID NO:99, SEQ ID NO:100 и SEQ ID NO:101, соответственно, и их консервативные аминокислотные замены.

[00997] В одном из вариантов осуществления агонист OX40 представляет собой биоаналогичное агонисту OX40 моноклональное антитело, одобренное регулирующими органами по лекарственным средствам со ссылкой на Hu106-222. В одном из вариантов осуществления биоаналогичное моноклональное антитело включает антитело к OX40, содержащее аминокислотную последовательность, обладающую по меньшей мере 97% идентичностью, например, 97%, 98%, 99% или 100% идентичностью, аминокислотной последовательности референтного лекарственного препарата или референтного биологического препарата, и содержащее одну или более посттрансляционных модификаций по сравнению с указанным референтным лекарственным препаратом или референтным биологическим препаратом, где указанный референтный лекарственный препарат или референтный биологический препарат представляет собой Hu106-222. В некоторых вариантах осуществления одна или более посттрансляционных модификаций выбраны из одной или более из следующих: гликозилирование, окисление, дезамидирование и усечение. В некоторых вариантах осуществления изобретения

биоаналог представляет собой антитело-агонист OX40, разрешенное или являющееся предметом заявки на разрешение, где указанное антитело-агонист OX40 представлено в составе, который отличается от составов референтного лекарственного препарата или референтного биологического препарата, где указанный референтный лекарственный препарат или референтный биологический препарат представляет собой Hu106-222. Антитело-агонист OX40 может быть разрешено регулирующим органом по лекарственным средствам, таким как FDA в США и/или EMA в Европейском Союзе. В некоторых вариантах осуществления биоаналог представлен в виде композиции, которая дополнительно содержит одно или более вспомогательных веществ, причем одно или более вспомогательных веществ являются такими же или отличными от вспомогательных веществ, содержащихся в референтном лекарственном препарате или референтном биологическом препарате, где указанный референтный лекарственный препарат или референтный биологический препарат представляет собой Hu106-222. В некоторых вариантах осуществления биоаналог представлен в виде композиции, которая дополнительно содержит одно или более вспомогательных веществ, причем одно или более вспомогательных веществ являются такими же или отличными от вспомогательных веществ, содержащихся в референтном лекарственном препарате или референтном биологическом препарате, где указанный референтный лекарственный препарат или референтный биологический препарат представляет собой Hu106-222.

ТАБЛИЦА 17: Аминокислотные последовательности для антител-агонистов OX40, относящиеся к Hu106-222.

Идентификатор	**Последовательность (однобуквенные обозначения аминокислот)**
SEQ ID NO:94 вариабельная область тяжелой цепи для 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 для Hu106-222	DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCKASQDVS TAVAWYQQKP GKAPKLLIYS ASYLYTGVPS 60 RFSGSGSGTD FTFTISSLQP EDIATYYCQQ HYSTPRTFGQ GTKLEIK 107
SEQ ID NO:96 CDR1 тяжелой цепи для Hu106-222	DYSMH 5
SEQ ID NO:97	WINTETGEPT YADDFKG 17

CDR2 тяжелой цепи для Hu106-222	
SEQ ID NO:98 CDR3 тяжелой цепи для Hu106-222	PYYDYVSYYA MDY 13
SEQ ID NO:99 CDR1 легкой цепи для Hu106-222	KASQDVSTAV A 11
SEQ ID NO:100 CDR2 легкой цепи для Hu106-222	SASYLYT 7
SEQ ID NO:101 CDR3 легкой цепи для Hu106-222	QQHYSTPRT 9

[00998] В некоторых вариантах осуществления антитело-агонист OX40 представляет собой MEDI6469 (также называемое 9B12). MEDI6469 представляет собой мышиное моноклональное антитело. Weinberg, *et al.*, *J. Immunother*. **2006**, *29*, 575-585. В некоторых вариантах осуществления агонист OX40 представляет собой антитело, продуцируемое гибридомой 9B12, депонированной в Biovest Inc. (Малверн, Массачусетс, США), как описано в источнике Weinberg, *et al.*, *J. Immunother*. **2006**, *29*, 575-585, содержание которого настоящим включено посредством ссылки в полном объеме. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит последовательности CDR MEDI6469. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит последовательность вариабельной области тяжелой цепи и/или последовательность вариабельной области легкой цепи MEDI6469.

[00999] В одном из вариантов осуществления агонист OX40 представляет собой L106 BD (Pharmingen, продукт №340420). В некоторых вариантах осуществления агонист OX40 содержит CDR антитела L106 (BD Pharmingen, продукт №340420). В некоторых вариантах осуществления агонист OX40 содержит последовательность вариабельной области тяжелой цепи и/или последовательность вариабельной области легкой цепи антитела L106 (BD Pharmingen, продукт №340420). В одном из вариантов осуществления агонист OX40 представляет собой ACT35 (Santa Cruz Biotechnology, № по каталогу 20073).

В некоторых вариантах осуществления агонист OX40 содержит CDR антитела ACT35 (Santa Cruz Biotechnology, № по каталогу 20073). В некоторых вариантах осуществления агонист OX40 содержит последовательность вариабельной области тяжелой цепи и/или последовательность вариабельной области легкой цепи антитела ACT35 (Santa Cruz Biotechnology, № по каталогу 20073). В одном из вариантов осуществления агонист OX40 представляет собой мышиное моноклональное антитело к mCD134/mOX40 (клон OX86), коммерчески доступное от InVivoMAb, BioXcell Inc, Вест Лебанон, Нью-Гэмпшир.

[001000] В одном из вариантов осуществления агонист OX40 выбран из агонистов OX40, описанных в публикациях международных патентных заявок WO 95/12673, WO 95/21925, WO 2006/121810, WO 2012/027328, WO 2013/028231, WO 2013/038191 и WO 2014/148895; Европейской патентной заявке EP 0672141; публикациях заявок на патент США US 2010/136030, US 2014/377284, US 2015/190506 и US 2015/132288 (включая клоны 20E5 и 12H3); и патентах США №№ 7504101, 7550140, 7622444, 7696175, 7960515, 7961515, 8133983, 9006399 и 9163085, содержание каждого из которых включено в настоящий документ посредством ссылки в полном объеме.

[001001] В одном из вариантов осуществления агонист OX40 представляет собой слитый белок-агонист OX40, представленный структурой I-A (слитый белок C-концевого фрагмента Fc антитела) или структурой I-B (слитый белок N-концевого фрагмента Fc антитела), или их фрагмент, производное, конъюгат, вариант или биоаналог. Свойства структур I-A и I-B описаны выше и в патентах США №№ 9359420, 9340599, 8921519 и 8450460, содержание которых включено в настоящий документ посредством ссылки. Аминокислотные последовательности для 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 соединения C-концевого Fc-антитела могут быть выбраны из вариантов осуществления, приведенных в SEQ ID NO:32 - SEQ ID NO:41, включая линкеры, подходящие для слияния дополнительных полипептидов. Аминокислотные последовательности для других полипептидных доменов структуры I-B приведены в таблице 10. Если фрагмент Fc антитела слит с N-концом слитого белка TNRFSF, как в структуре I-B, последовательность модуля Fc предпочтительно представляет собой последовательность, представленную в SEQ ID NO:42, и линкерные последовательности предпочтительно выбраны из вариантов осуществления, представленных в SED ID NO:43 - SEQ ID NO:45.

[001002] В одном из вариантов осуществления слитый белок-агонист OX40, соответствующий структурам I-A или I-B, содержит один или более связывающих OX40 доменов, выбранных из группы, состоящей из вариабельной области тяжелой цепи и вариабельной области легкой цепи таволиксизумаба, вариабельной области тяжелой цепи и вариабельной области легкой цепи 11D4, вариабельной области тяжелой цепи и вариабельной области легкой цепи 18D8, вариабельной области тяжелой цепи и

вариабельной области легкой цепи Hu119-122, вариабельной области тяжелой цепи и вариабельной области легкой цепи Hu106-222, вариабельной области тяжелой цепи и вариабельной области легкой цепи, выбранных из вариабельных областей тяжелой цепи и вариабельных областей легкой цепи, описанных в таблице 17, любой комбинации вариабельной области тяжелой цепи и вариабельной области легкой цепи из вышеуказанных, а также их фрагментов, производных, конъюгатов, вариантов и биоаналогов.

[001003] В одном из вариантов осуществления слитый белок-агонист OX40, соответствующий структурам I-A или I-B, содержит один или более связывающих OX40 доменов, содержащих последовательность OX40L. В одном из вариантов осуществления слитый белок-агонист OX40, соответствующий структурам I-A или I-B, содержит один или более связывающих OX40 доменов, содержащих последовательность согласно SEQ ID NO:102. В одном из вариантов осуществления слитый белок-агонист OX40, соответствующий структурам I-A или I-B, содержит один или более связывающих OX40 доменов, содержащих последовательность растворимого OX40L. В одном из вариантов осуществления слитый белок-агонист OX40, соответствующий структурам I-A или I-B, содержит один или более связывающих OX40 доменов, содержащих последовательность согласно SEQ ID NO:103. В одном из вариантов осуществления слитый белок-агонист OX40, соответствующий структурам I-A или I-B, содержит один или более связывающих OX40 доменов, содержащих последовательность согласно SEQ ID NO:104.

[001004] В одном из вариантов осуществления 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 показанным последовательностям, представленным в SEQ ID NO:58 и SEQ ID NO:59, соответственно, где домены V_H и V_L соединены линкером. В одном из вариантов осуществления слитый белок-агонист OX40, 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 показанным последовательностям, представленным в SEQ ID NO:68 и SEQ ID NO:69, соответственно, где домены V_H и V_L соединены линкером. В одном из вариантов осуществления слитый белок-агонист OX40, 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 показанным последовательностям, представленным в SEQ ID NO:78 и SEQ ID NO:79, соответственно, где домены V_H и V_L соединены линкером. В одном из вариантов осуществления слитый белок-агонист OX40, 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 показанным последовательностям, представленным в SEQ ID NO:86 и SEQ ID NO:87, соответственно, где домены V_H и V_L

соединены линкером. В одном из вариантов осуществления слитый белок-агонист OX40, 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 показанным последовательностям, представленным в SEQ ID NO:94 и SEQ ID NO:95, соответственно, где домены V_H и V_L соединены линкером. В одном из вариантов осуществления слитый белок-агонист OX40, 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, представленным в таблице 14, где домены V_H и V_L соединены линкером.

ТАБЛИЦА 18: Дополнительные полипептидные домены, подходящие в качестве связывающих OX40 доменов в слитых белках (например, структурах 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)	YPRIQSIKVQ FTEYKKEKGF ILTSQKEDEI MKVQNNSVII NCDGFYLISL KGYFSQEVNI 60 SLHYQKDEEP LFQLKKVRSV NSLMVASLTY KDKVYLNVTT DNTSLDDFHV NGGELILIHQ 120 NPGEFCVL 128
SEQ ID NO:105 вариабельная область тяжелой цепи для 008	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS NYTMNWVRQA PGKGLEWVSA ISGSGGSTYY 60 ADSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCAKDR YSQVHYALDY WGQGTLVTVS 120
SEQ ID NO:106	DIVMTQSPDS LPVTPGEPAS ISCRSSQSLL HSNGYNYLDW

вариабельная область легкой цепи для 008	YLQKAGQSPQ LLIYLGSNRA 60 SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYCQQYYNHP TTFGQGTK 108
SEQ ID NO:107 вариабельная область тяжелой цепи для 011	EVQLVESGGG VVQPGRSLRL SCAASGFTFS DYTMNWVRQA PGKGLEWVSS ISGGSTYYAD 60 SRKGRFTISR DNSKNTLYLQ MNNLRAEDTA VYYCARDRYF RQQNAFDYWG QGTLVTVSSA 120
SEQ ID NO:108 вариабельная область легкой цепи для 011	DIVMTQSPDS LPVTPGEPAS ISCRSSQSLL HSNGYNYLDW YLQKAGQSPQ LLIYLGSNRA 60 SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYCQQYYNHP TTFGQGTK 108
SEQ ID NO:109 вариабельная область тяжелой цепи для 021	EVQLVESGGG LVQPRGSLRL SCAASGFTFS SYAMNWVRQA PGKGLEWVAV ISYDGSNKYY 60 ADSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCAKDR YITLPNALDY WGQGTLVTVS 120
SEQ ID NO:110 вариабельная область легкой цепи для 021	DIQMTQSPVS LPVTPGEPAS ISCRSSQSLL HSNGYNYLDW YLQKPGQSPQ LLIYLGSNRA 60 SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYCQQYKSNP PTFGQGTK 108
SEQ ID NO:111 вариабельная область тяжелой цепи для 023	EVQLVESGGG LVHPGGSLRL SCAGSGFTFS SYAMHWVRQA PGKGLEWVSA IGTGGGTYYA 60 DSVMGRFTIS RDNSKNTLYL QMNSLRAEDT AVYYCARYDN VMGLYWFDYW GQGTLVTVSS 120
SEQ ID NO:112 вариабельная область легкой цепи для 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 гуманизированн	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASEYEFP SHDMSWVRQA PGKGLELVAA INSDGGSTYY 60 PDTMERRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TAVYYCARHY

ого антитела	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

[001005] В одном из вариантов осуществления агонист OX40 представляет собой одноцепочечный слитый полипептид-агонист OX40, 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, и где дополнительный домен представляет собой домен фрагмента Fab или Fc. В одном из вариантов осуществления агонист OX40 представляет собой одноцепочечный слитый полипептид-агонист OX40, 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, где дополнительный домен представляет собой домен фрагмента Fab или Fc, причем в каждом из растворимых связывающих OX40 доменов отсутствует стеблевая область (которая способствует тримеризации и обеспечивает определенное расстояние до клеточной мембраны, но не является частью связывающего OX40 домена), и первый и второй пептидные линкеры независимо друг от друга имеют длину 3-8 аминокислот.

[001006] В одном из вариантов осуществления агонист OX40 представляет собой одноцепочечный слитый полипептид-агонист OX40, содержащий (i) первый растворимый

домен цитокина из надсемейства факторов некроза опухоли (TNF), (ii) первый пептидный линкер, (iii) второй растворимый домен цитокина из надсемейства TNF, (iv) второй пептидный линкер и (v) третий растворимый домен цитокина из надсемейства TNF, где в каждом из растворимых доменов цитокина из надсемейства TNF отсутствует стеблевая область, и первый и второй пептидные линкеры независимо друг от друга имеют длину 3-8 аминокислот, и где домен цитокина из надсемейства TNF является связывающим OX40 доменом.

[001007] В некоторых вариантах осуществления агонист OX40 представляет собой MEDI6383. MEDI6383 представляет собой слитый белок-агонист OX40 и может быть получен, как описано в патенте США № 6312700, содержание которого включено в настоящий документ посредством ссылки.

[001008] В одном из вариантов осуществления агонист OX40 представляет собой агонистическое scFv-антитело к OX40, содержащее любой из вышеуказанных доменов V_H, связанный с любым из вышеуказанных доменов V_L.

[001009] В одном из вариантов осуществления агонист OX40 представляет собой моноклональное антитело-агонист Creative Biolabs OX40 MOM-18455, коммерчески доступное от Creative Biolabs, Inc., Ширли, Нью-Йорк, США.

[001010] В одном из вариантов осуществления агонист OX40 представляет собой клон Ber-ACT35 агонистического антитела к OX40, коммерчески доступный от BioLegend, Inc., Сан-Диего, Калифорния, США.

Необязательный анализ жизнеспособности клеток

[001011] Необязательно, после примирующей первой экспансии (иногда называемой начальной общей экспансией) может быть проведен анализ жизнеспособности клеток с использованием стандартных анализов, известных в данной области техники. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления способ включает проведение анализа жизнеспособности клеток после примирующей первой экспансии. Например, на образце общей массы TIL может быть проведен анализ по вытеснению трипанового синего, который избирательно маркирует мертвые клетки и позволяет оценить жизнеспособность. Другие анализы для применения в тестировании жизнеспособности могут включать, не ограничиваясь перечисленным, анализ Alamar blue; и анализ MTT.

1. Подсчет клеток, жизнеспособность, проточная цитометрия

[001012] В некоторых вариантах осуществления измеряют количество и/или жизнеспособность клеток. Экспрессия маркеров, таких как, не ограничиваясь перечисленным, CD3, CD4, CD8 и CD56, а также любых других, раскрытых или описанных в настоящем документе, может быть измерена методом проточной цитометрии с антителами, например, не ограничиваясь перечисленным, коммерчески доступными от BD Bio-sciences (BD Biosciences, Сан-Хосе, Калифорния) с использованием проточного цитометра FACSCanto™ (BD Biosciences). Клетки могут быть подсчитаны вручную с использованием одноразового гемоцитометра c-chip (VWR, Батавия, Иллинойс), а жизнеспособность может быть оценена любым способом, известным в данной области

техники, включая, не ограничиваясь перечисленным, окрашивание трипановым синим. Жизнеспособность клеток также может быть проанализирована на основании USSN 15/863,634, включенного в настоящий документ посредством ссылки в полном объеме. Жизнеспособность клеток также может быть проанализирована на основании публикации патента США № 2018/0280436 или публикации международной патентной заявки WO/2018/081473, оба из которых включены в настоящий документ для всех целей в полном объеме.

[001013] В некоторых случаях общая популяция TIL может быть сразу же криоконсервирована с использованием протоколов, обсуждаемых ниже. В качестве альтернативы, общая популяция TIL может быть подвергнута REP, а затем криоконсервирована, как обсуждается ниже. Аналогичным образом, в случае, когда генетически модифицированные TIL будут применяться в терапии, общая масса или популяции REP TIL могут быть подвергнуты генетическим модификациям для подходящей обработки.

2. Клеточные культуры

[001014] В одном из вариантов осуществления способ экспансии TIL, включая описанный выше, а также проиллюстрированный на фиг. 1, в частности, например, фиг. 1B и/или фиг. 1C, может включать применение от приблизительно 5000 мл до приблизительно 25000 мл клеточной среды, от приблизительно 5000 мл до приблизительно 10000 мл клеточной среды или от приблизительно 5800 мл до приблизительно 8700 мл клеточной среды. В некоторых вариантах осуществления среда представляет собой бессывороточную среду. В некоторых вариантах осуществления среда для примирующей первой экспансии является бессывороточной. В некоторых вариантах осуществления среда для второй экспансии является бессывороточной. В некоторых вариантах осуществления среда как для примирующей первой экспансии, так и для второй экспансии (также называемой быстрой второй экспансией) является бессывороточной. В одном из вариантов осуществления для увеличения количества TIL используют не более одного типа среды для культивирования клеток. Может быть использована любая подходящая среда для культивирования клеток, например, клеточная среда AIM-V (L-глутамин, 50 мкМ стрептомицина сульфата и 10 мкМ гентамицина сульфата) для культивирования клеток (Invitrogen, Карлсбад, Калифорния). В этом отношении способы согласно изобретению обладают преимуществом, состоящим в том, что они позволяют уменьшить количество среды и количество типов сред, необходимых для увеличения количества TIL. В одном из вариантов осуществления увеличение количества TIL может включать подпитку клеток не чаще, чем раз в три или четыре дня. Увеличение количества клеток в газопроницаемом контейнере упрощает процедуры, необходимые для увеличения количества клеток, за счет уменьшения частоты подпитки, необходимой для экспансии клеток.

[001015] В одном из вариантов осуществления среда для культивирования клеток в первом и/или втором газопроницаемом контейнере является нефильтрованной. Использование нефильтрованной клеточной среды может упростить процедуры,

необходимые для увеличения количества клеток. В одном из вариантов осуществления клеточная среда в первом и/или втором газопроницаемом контейнере не содержит бета-меркаптоэтанола (BME).

[001016] В одном варианте осуществления продолжительность способа включает получение образца опухолевой ткани от млекопитающего; культивирование образца опухолевой ткани в первом газопроницаемом контейнере, содержащем клеточную среду, включающую IL-2, однократную концентрацию (1X) антигенпрезентирующих фидерных клеток и OKT-3, в течение приблизительно от 1 до 8 дней, например, приблизительно 8 дней, в качестве примирующей первой экспансии; перенос TIL во второй газопроницаемый контейнер и увеличение количества TIL во втором газопроницаемом контейнере, содержащем клеточную среду, включающую IL-2, двукратную концентрацию (2X) антигенпрезентирующих фидерных клеток и OKT-3, в течение приблизительно от 7 до 9 дней, например, приблизительно 7 дней, приблизительно 8 дней или приблизительно 9 дней.

[001017] В одном варианте осуществления продолжительность способа включает получение образца опухолевой ткани от млекопитающего; культивирование образца опухолевой ткани в первом газопроницаемом контейнере, содержащем клеточную среду, включающую IL-2, однократную концентрацию (1X) антигенпрезентирующих фидерных клеток и OKT-3, в течение приблизительно от 1 до 7 дней, например, приблизительно 7 дней, в качестве примирующей первой экспансии; перенос TIL во второй газопроницаемый контейнер и увеличение количества TIL во втором газопроницаемом контейнере, содержащем клеточную среду, включающую IL-2, двукратную концентрацию (2X) антигенпрезентирующих фидерных клеток и OKT-3, в течение приблизительно от 7 до 9 дней, например, приблизительно 7 дней, приблизительно 8 дней или приблизительно 9 дней.

[001018] В одном варианте осуществления продолжительность способа включает получение образца опухолевой ткани от млекопитающего; культивирование образца опухолевой ткани в первом газопроницаемом контейнере, содержащем клеточную среду, включающую IL-2, однократную концентрацию (1X) антигенпрезентирующих фидерных клеток и OKT-3, в течение приблизительно от 1 до 7 дней, например, приблизительно 7 дней, в качестве примирующей первой экспансии; перенос TIL во второй газопроницаемый контейнер и увеличение количества TIL во втором газопроницаемом контейнере, содержащем клеточную среду, включающую IL-2, двукратную концентрацию (2X) антигенпрезентирующих фидерных клеток и OKT-3, в течение приблизительно от 7 до 10 дней, например, приблизительно 7 дней, приблизительно 8 дней, приблизительно 9 дней или приблизительно 10 дней.

[001019] В одном из вариантов осуществления TIL подвергают экспансии в газопроницаемых контейнерах. Газопроницаемые контейнеры использовали для экспансии TIL с использованием МНПК с помощью способов, композиций и устройств, известных в данной области техники, в том числе описанных в публикации заявки на патент США №

2005/0106717 A1, содержание которой включено в настоящий документ посредством ссылки. В одном из вариантов осуществления TIL подвергают экспансии в газопроницаемых пакетах. В одном из вариантов осуществления TIL подвергают экспансии с использованием системы экспансии клеток, которая позволяет проводить экспансию TIL в газопроницаемых пакетах, такой как Xuri Cell Expansion System W25 (GE Healthcare). В одном из вариантов осуществления TIL подвергают экспансии с использованием системы экспансии клеток, которая позволяет проводить экспансию TIL в газопроницаемых пакетах, такой как WAVE Bioreactor System, также известной как Xuri Cell Expansion System W5 (GE Healthcare). В одном из вариантов осуществления система экспансии клеток включает газопроницаемый пакет для клеток 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.

[001020] В одном из вариантов осуществления TIL могут быть подвергнуты экспансии в колбах G-Rex (коммерчески доступных от Wilson Wolf Manufacturing). Такие варианты осуществления позволяют клеточным популяциям увеличиваться в численности от приблизительно 5×10^5 клеток/см^2 до от 10×10^6 до 30×10^6 клеток/см^2. В одном из вариантов осуществления это осуществляется без подпитки. В одном из вариантов осуществления это осуществляется без подпитки, при условии, что высота среды в колбе G-Rex составляет приблизительно 10 см. В одном из вариантов осуществления это осуществляется без подпитки, но с добавлением одного или более цитокинов. В одном из вариантов осуществления цитокин может быть добавлен в виде болюса без необходимости смешивать цитокин со средой. Такие контейнеры, устройства и способы известны в данной области техники и использовались для экспансии TIL, и включают описанные в публикации заявки на патент США US 2014/0377739A1, публикации международной патентной заявки WO 2014/210036 A1, публикации заявки на патент США US 2013/0115617 A1, публикации международной патентной заявки WO 2013/188427 A1, публикации заявки на патент США US 2011/0136228 A1, патенте США US 8809050 B2, публикации международной патентной заявки WO 2011/072088 A2, публикации заявки на патент США US 2016/0208216 A1, публикации заявки на патент США US 2012/0244133 A1, публикации международной патентной заявки WO 2012/129201 A1, публикации заявки на патент США 2013/0102075 A1, патенте США US 8956860 B2, публикации международной патентной заявки WO 2013/173835 A1, публикации заявки 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.

Необязательная генетическая модификация TIL

[001021] В некоторых вариантах осуществления подвергнутые экспансии TIL согласно настоящему изобретению подвергают дополнительным манипуляциям до, во

время или после этапа экспансии, в том числе во время производственных процессов в закрытых стерильных условиях, каждый из которых предусмотрен в настоящем документе, для временного изменения экспрессии белка. В некоторых вариантах осуществления временное изменение экспрессии белка происходит из-за временного редактирования гена. В некоторых вариантах осуществления подвергнутые экспансии TIL согласно настоящему изобретению обрабатывают факторами транскрипции (TF) и/или другими молекулами, способными временно изменять экспрессию белка в TIL. В некоторых вариантах осуществления TF и/или другие молекулы, способные временно изменять экспрессию белка, обеспечивают измененную экспрессию опухолевых антигенов и/или изменение количества специфичных к опухолевым антигенам Т-клеток в популяции TIL.

[001022] В отдельных вариантах осуществления способ включает генетическое редактирование популяции TIL. В отдельных вариантах осуществления способ включает генетическое редактирование первой популяции TIL, второй популяции TIL и/или третьей популяции TIL.

[001023] В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение включает генетическое редактирование посредством вставки нуклеотидов, например, вставки рибонуклеиновой кислоты (РНК), включая вставку информационной РНК (иРНК) или малой (или короткой) интерферирующей РНК (миРНК), в популяцию TIL для стимулирования экспрессии одного или более белков или ингибирования экспрессии одного или более белков, а также одновременных комбинаций активации одного набора белков с ингибированием при этом другого набора белков.

[001024] В некоторых вариантах осуществления подвергнутые экспансии TIL согласно настоящему изобретению претерпевают временное изменение экспрессии белка. В некоторых вариантах осуществления временное изменение экспрессии белка происходит в общей популяции TIL до первой экспансии, 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). В некоторых вариантах осуществления временное изменение экспрессии белка происходит во время первой экспансии, в том числе, например, в популяции TIL, подвергнутой экспансии, например, на этапе B, как показано на фиг. 1 (например, фиг. 1B). В некоторых вариантах осуществления временное изменение экспрессии белка происходит после первой экспансии, в том числе, например, в популяции TIL, находящейся в процессе перехода между первой и второй экспансией (например, второй популяции TIL, как описано в настоящем документе), популяции TIL, полученной, например, на этапе B и включенной на этап C, как показано на фиг. 1. В некоторых вариантах осуществления временное изменение экспрессии белка происходит в общей популяции TIL до второй экспансии, в том числе, например, в популяции TIL, полученной, например, на этапе C и до ее экспансии на этапе D, как показано на фиг. 1. В некоторых вариантах осуществления временное изменение экспрессии белка происходит во время второй экспансии, в том числе, например, в популяции TIL, подвергнутой экспансии, например, на этапе D, как показано на фиг. 1 (например, третьей популяции TIL). В некоторых вариантах

осуществления временное изменение экспрессии белка происходит после второй экспансии, в том числе, например, в популяции TIL, полученной в результате экспансии, например, на этапе D, как показано на фиг. 1.

[001025] В одном из вариантов осуществления способ временного изменения экспрессии белка в популяции TIL включает этап электропорации. Способы электропорации известны в данной области техники и описаны, например, в источнике Tsong, *Biophys. J.* 1991, *60,* 297-306 и публикации заявки на патент США № 2014/0227237 A1, содержание каждого из которых включены в настоящий документ посредством ссылки. В одном из вариантов осуществления способ временного изменения экспрессии белка в популяции TIL включает этап кальций-фосфатной трансфекции. Способы кальций-фосфатной трансфекции (осаждение ДНК фосфатом кальция, покрытие клеточной поверхности и эндоцитоз) известны в данной области техники и описаны в Graham and van der Eb, *Virology* 1973, *52,* 456-467; Wigler, *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1979, *76,* 1373-1376; и Chen and Okayarea, *Mol. Cell. Biol.* 1987, *7,* 2745-2752; и в патенте США № 5593875, содержание каждого из которых включено в настоящий документ посредством ссылки. В одном из вариантов осуществления способ временного изменения экспрессии белка в популяции TIL включает этап липосомальной трансфекции. Способы липосомальной трансфекции, такие как способы, в которых используется липосомальной состав 1:1 (мас./мас.) катионного липида *N*-[1-(2,3-диолеилокси)пропил]-*n, n,n*-триметиламмонийхлорида (DOTMA) и диолеоилфосфотидилэтаноламина (DOPE) в фильтрованной воде, известны в данной области техники и описаны в Rose, *et al.*, *Biotechniques* 1991, *10,* 520-525 и Felgner, *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1987, *84,* 7413-7417, и в патентах США №№ 5279833, 5908635, 6056938, 6110490, 6534484 и 7687070, содержание каждого из которых включено в настоящий документ посредством ссылки. В одном из вариантов осуществления способ временного изменения экспрессии белка в популяции TIL включает этап трансфекции с использованием способов, описанных в патентах США №№ 5766902, 6025337, 6410517, 6475994 и 7189705, содержание каждого из которых включено в настоящий документ посредством ссылки.

[001026] В некоторых вариантах осуществления временное изменение экспрессии белка приводит к увеличению Т-стволовых клеток памяти (TSCM). TSCM являются ранними предшественниками антиген-стимулированных Т-клеток центральной памяти. TSCM обычно проявляют способности к долгосрочному выживанию, самообновлению и мультипотентности, которые определяют стволовые клетки, и, как правило, желательны для создания эффективных продуктов TIL. TSCM продемонстрировали повышенную противоопухолевую активность по сравнению с другими субпопуляциями Т-клеток в мышиных моделях адоптивного переноса клеток (Gattinoni *et al.* Nat Med 2009, 2011; Gattinoni, Nature Rev. Cancer, 2012; Cieri *et al.* Blood 2013). В некоторых вариантах осуществления временное изменение экспрессии белка обеспечивает популяцию TIL с составом, содержащим высокую долю TSCM. В некоторых вариантах осуществления временное изменение экспрессии белка приводит к увеличению процентной доли TSCM по

меньшей мере на 5%, по меньшей мере на 10%, по меньшей мере на 10%, по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 25%, по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 35%, по меньшей мере на 40%, по меньшей мере на 45%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 55%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 65%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90% или по меньшей мере на 95%. В некоторых вариантах осуществления 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. В некоторых вариантах осуществления временное изменение экспрессии белка обеспечивает популяцию TIL с по меньшей мере по меньшей мере по меньшей мере 5%, по меньшей мере 10%, по меньшей мере 10%, по меньшей мере 20%, по меньшей мере 25%, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 35%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 45%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 55%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95% TSCM. В некоторых вариантах осуществления временное изменение экспрессии белка обеспечивает терапевтическую популяцию TIL с по меньшей мере по меньшей мере 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.

[001027] В некоторых вариантах осуществления временное изменение экспрессии белка приводит к восстановлению антиген-стимулированных Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления восстановление включает, например, повышенную пролиферацию, повышенную активацию Т-клеток и/или повышенное распознавание антигена.

[001028] В некоторых вариантах осуществления временное изменение экспрессии белка изменяет экспрессию в большой фракции Т-клеток, чтобы сохранить репертуар происходящих из опухоли TCR. В некоторых вариантах осуществления временное изменение экспрессии белка не изменяет репертуар происходящих из опухоли TCR. В некоторых вариантах осуществления временное изменение экспрессии белка поддерживает репертуар происходящих из опухоли TCR.

[001029] В некоторых вариантах осуществления временное изменение белка приводит к изменению экспрессии конкретного гена. В некоторых вариантах осуществления временное изменение экспрессии белка нацелено на ген, включая, не ограничиваясь перечисленным, PD-1 (также называемый PDCD1 или CC279), TGFBR2, CCR4/5, CBLB (CBL-B), CISH, CCR (химерные костимулирующие рецепторы), IL-2, IL-12, IL-15, IL-21, NOTCH 1/2 ICD, TIM3, LAG3, TIGIT, TGFβ, CCR2, CCR4, CCR5, CXCR1, CXCR2, CSCR3, CCL2 (MCP-1), CCL3 (MIP-1α), CCL4 (MIP1-β), CCL5 (RANTES),

CXCL1/CXCL8, CCL22, CCL17, CXCL1/CXCL8, VHL, CD44, PIK3CD, SOCS1 и/или цАМФ-зависимую протеинкиназу A (PKA). В некоторых вариантах осуществления временное изменение экспрессии белка нацелено на ген, выбранный из группы, состоящей PD-1, TGFBR2, CCR4/5, CBLB (CBL-B), CISH, CCR (химерные костимулирующие рецепторы), IL-2, IL-12, IL-15, IL-21, NOTCH 1/2 ICD, TIM3, LAG3, TIGIT, TGFβ, CCR2, CCR4, CCR5, CXCR1, CXCR2, CSCR3, CCL2 (MCP-1), CCL3 (MIP-1α), CCL4 (MIP1-β), CCL5 (RANTES), CXCL1/CXCL8, CCL22, CCL17, CXCL1/CXCL8, VHL, CD44, PIK3CD, SOCS1 и/или цАМФ-зависимой протеинкиназы A (PKA). В некоторых вариантах осуществления временное изменение экспрессии белка нацелено на PD-1. В некоторых вариантах осуществления временное изменение экспрессии белка нацелено на TGFBR2. В некоторых вариантах осуществления временное изменение экспрессии белка нацелено на CCR4/5. В некоторых вариантах осуществления временное изменение экспрессии белка нацелено на CBLB. В некоторых вариантах осуществления временное изменение экспрессии белка нацелено на CISH. В некоторых вариантах осуществления временное изменение экспрессии белка нацелено на CCR (химерные костимулирующие рецепторы). В некоторых вариантах осуществления временное изменение экспрессии белка нацелено на IL-2. В некоторых вариантах осуществления временное изменение экспрессии белка нацелено на IL-12. В некоторых вариантах осуществления временное изменение экспрессии белка нацелено на IL-15. В некоторых вариантах осуществления временное изменение экспрессии белка нацелено на IL-21. В некоторых вариантах осуществления временное изменение экспрессии белка нацелено на NOTCH 1/2 ICD. В некоторых вариантах осуществления временное изменение экспрессии белка нацелено на TIM3. В некоторых вариантах осуществления временное изменение экспрессии белка нацелено на LAG3. В некоторых вариантах осуществления временное изменение экспрессии белка нацелено на TIGIT. В некоторых вариантах осуществления временное изменение экспрессии белка нацелено на TGFβ. В некоторых вариантах осуществления временное изменение экспрессии белка нацелено на CCR1. В некоторых вариантах осуществления временное изменение экспрессии белка нацелено на CCR2. В некоторых вариантах осуществления временное изменение экспрессии белка нацелено на CCR4. В некоторых вариантах осуществления временное изменение экспрессии белка нацелено на CCR5. В некоторых вариантах осуществления временное изменение экспрессии белка нацелено на CXCR1. В некоторых вариантах осуществления временное изменение экспрессии белка нацелено на CXCR2. В некоторых вариантах осуществления временное изменение экспрессии белка нацелено на CSCR3. В некоторых вариантах осуществления временное изменение экспрессии белка нацелено на CCL2 (MCP-1). В некоторых вариантах осуществления временное изменение экспрессии белка нацелено на CCL3 (MIP-1α). В некоторых вариантах осуществления временное изменение экспрессии белка нацелено на CCL4 (MIP1-β). В некоторых вариантах осуществления временное изменение экспрессии белка нацелено на CCL5 (RANTES). В некоторых вариантах осуществления временное изменение экспрессии белка нацелено на CXCL1. В некоторых вариантах осуществления временное

изменение экспрессии белка нацелено на CXCL8. В некоторых вариантах осуществления временное изменение экспрессии белка нацелено на CCL22. В некоторых вариантах осуществления временное изменение экспрессии белка нацелено на CCL17. В некоторых вариантах осуществления временное изменение экспрессии белка нацелено на VHL. В некоторых вариантах осуществления временное изменение экспрессии белка нацелено на CD44. В некоторых вариантах осуществления временное изменение экспрессии белка нацелено на PIK3CD. В некоторых вариантах осуществления временное изменение экспрессии белка нацелено на SOCS1. В некоторых вариантах осуществления временное изменение экспрессии белка нацелено на цАМФ-зависимую протеинкиназу А (PKA).

[001030] В некоторых вариантах осуществления временное изменение экспрессии белка приводит к повышенной экспрессии и/или сверхэкспрессии хемокинового рецептора. В некоторых вариантах осуществления хемокиновый рецептор, который сверхэкспрессируется из-за временной экспрессии белка, включает рецептор с лигандом, включающим, не ограничиваясь перечисленным, CCL2 (MCP-1), CCL3 (MIP-1α), CCL4 (MIP1-β), CCL5 (RANTES), CXCL1, CXCL8, CCL22 и/или CCL17.

[001031] В некоторых вариантах осуществления временное изменение экспрессии белка приводит к понижению и/или уменьшенной экспрессии PD-1, CTLA-4, TIM-3, LAG-3, TIGIT, TGFβR2 и/или TGFβ (включая приводящие, например, к блокаде пути TGFβ). В некоторых вариантах осуществления временное изменение экспрессии белка приводит к понижению и/или уменьшенной экспрессии CBLB (CBL-B). В некоторых вариантах осуществления временное изменение экспрессии белка приводит к понижению и/или уменьшенной экспрессии CISH.

[001032] В некоторых вариантах осуществления временное изменение экспрессии белка приводит к повышенной экспрессии и/или сверхэкспрессии хемокиновых рецепторов, например, для улучшения миграции или перемещения TIL к месту опухоли. В некоторых вариантах осуществления временное изменение экспрессии белка приводит к повышенной экспрессии и/или сверхэкспрессии CCR (химерного костимулирующего рецептора). В некоторых вариантах осуществления временное изменение экспрессии белка приводит к повышенной экспрессии и/или сверхэкспрессии хемокинового рецептора, выбранного из группы, состоящей из CCR1, CCR2, CCR4, CCR5, CXCR1, CXCR2 и/или CSCR3.

[001033] В некоторых вариантах осуществления временное изменение экспрессии белка приводит к повышенной экспрессии и/или сверхэкспрессии интерлейкина. В некоторых вариантах осуществления временное изменение экспрессии белка приводит к повышенной экспрессии и/или сверхэкспрессии интерлейкина, выбранного из группы, состоящей из IL-2, IL-12, IL-15 и/или IL-21.

[001034] В некоторых вариантах осуществления временное изменение экспрессии белка приводит к повышенной экспрессии и/или сверхэкспрессии NOTCH 1/2 ICD. В некоторых вариантах осуществления временное изменение экспрессии белка приводит к повышенной экспрессии и/или сверхэкспрессии VHL. В некоторых вариантах

осуществления временное изменение экспрессии белка приводит к повышенной экспрессии и/или сверхэкспрессии CD44. В некоторых вариантах осуществления временное изменение экспрессии белка приводит к повышенной экспрессии и/или сверхэкспрессии PIK3CD. В некоторых вариантах осуществления временное изменение экспрессии белка приводит к повышенной экспрессии и/или сверхэкспрессии SOCS1.

[001035] В некоторых вариантах осуществления временное изменение экспрессии белка приводит к пониженной и/или уменьшенной экспрессии цАМФ-зависимой протеинкиназы А (PKA).

[001036] В некоторых вариантах осуществления временное изменение экспрессии белка приводит к пониженной и/или уменьшенной экспрессии молекулы, выбранной из группы, состоящей из PD-1, LAG3, TIM3, CTLA-4, TIGIT, CISH, TGFβR2, PKA, CBLB, BAFF (BR3), и их комбинаций. В некоторых вариантах осуществления временное изменение экспрессии белка приводит к пониженной и/или уменьшенной экспрессии двух молекул, выбранных из группы, состоящей из PD-1, LAG3, TIM3, CTLA-4, TIGIT, CISH, TGFβR2, PKA, CBLB, BAFF (BR3), и их комбинаций. В некоторых вариантах осуществления временное изменение экспрессии белка приводит к пониженной и/или уменьшенной 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. В некоторых вариантах осуществления временное изменение экспрессии белка приводит к пониженной и/или уменьшенной экспрессии PD-1, LAG-3, CISH, CBLB, TIM3 и их комбинаций. В некоторых вариантах осуществления временное изменение экспрессии белка приводит к пониженной и/или уменьшенной экспрессии PD-1 и одной из LAG3, CISH, CBLB, TIM3 и их комбинаций. В некоторых вариантах осуществления временное изменение экспрессии белка приводит к пониженной и/или уменьшенной экспрессии PD-1 и LAG3. В некоторых вариантах осуществления временное изменение экспрессии белка приводит к пониженной и/или уменьшенной экспрессии PD-1 и CISH. В некоторых вариантах осуществления временное изменение экспрессии белка приводит к пониженной и/или уменьшенной экспрессии PD-1 и CBLB. В некоторых вариантах осуществления временное изменение экспрессии белка приводит к пониженной и/или уменьшенной экспрессии LAG3 и CISH. В некоторых вариантах осуществления временное изменение экспрессии белка приводит к пониженной и/или уменьшенной экспрессии LAG3 и CBLB. В некоторых вариантах осуществления временное изменение экспрессии белка приводит к пониженной и/или уменьшенной экспрессии CISH и CBLB. В некоторых вариантах осуществления временное изменение экспрессии белка приводит к пониженной и/или уменьшенной экспрессии TIM3 и PD-1. В некоторых вариантах осуществления временное изменение экспрессии белка приводит к пониженной и/или уменьшенной экспрессии TIM3 и LAG3. В некоторых вариантах осуществления временное изменение экспрессии белка приводит к пониженной и/или уменьшенной экспрессии TIM3 и CISH. В некоторых вариантах осуществления временное изменение экспрессии белка приводит к пониженной и/или уменьшенной экспрессии TIM3 и CBLB.

[001037] В некоторых вариантах осуществления молекула адгезии, выбранная из группы, состоящей из CCR2, CCR4, CCR5, CXCR2, CXCR3, CX3CR1 и их комбинаций, вставляется гаммаретровирусным или лентивирусным методом в первую популяцию TIL, вторую популяцию TIL или собранную популяцию TIL (например, увеличивается экспрессия молекулы адгезии).

[001038] В некоторых вариантах осуществления временное изменение экспрессии белка приводит к пониженной и/или уменьшенной экспрессии молекулы, выбранной из группы, состоящей из PD-1, LAG3, TIM3, CTLA-4, TIGIT, CISH, TGFβR2, PKA, CBLB, BAFF (BR3), и их комбинаций, и повышенной и/или усиленной экспрессии CCR2, CCR4, CCR5, CXCR2, CXCR3, CX3CR1 и их комбинаций. В некоторых вариантах осуществления временное изменение экспрессии белка приводит к пониженной и/или уменьшенной экспрессии молекулы, выбранной из группы, состоящей из PD-1, LAG3, TIM3, CISH, CBLB, и их комбинаций, и повышенной и/или усиленной экспрессии CCR2, CCR4, CCR5, CXCR2, CXCR3, CX3CR1 и их комбинаций.

[001039] В некоторых вариантах осуществления имеет место уменьшение экспрессии на 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%. В некоторых вариантах осуществления имеет место уменьшение экспрессии на по меньшей мере приблизительно 65%, приблизительно 70%, приблизительно 75%, приблизительно 80%, приблизительно 85%, приблизительно 90% или приблизительно 95%. В некоторых вариантах осуществления имеет место уменьшение экспрессии на по меньшей мере приблизительно 75%, приблизительно 80%, приблизительно 85%, приблизительно 90% или приблизительно 95%. В некоторых вариантах осуществления имеет место уменьшение экспрессии на по меньшей мере приблизительно 80%, приблизительно 85%, приблизительно 90% или приблизительно 95%. В некоторых вариантах осуществления имеет место уменьшение экспрессии на по меньшей мере приблизительно 85%, приблизительно 90% или приблизительно 95%. В некоторых вариантах осуществления имеет место уменьшение экспрессии на по меньшей мере приблизительно 80%. В некоторых вариантах осуществления имеет место уменьшение экспрессии на по меньшей мере приблизительно 85%. В некоторых вариантах осуществления имеет место уменьшение экспрессии на по меньшей мере приблизительно 90%. В некоторых вариантах осуществления имеет место уменьшение экспрессии на по меньшей мере приблизительно 95%. В некоторых вариантах осуществления имеет место уменьшение экспрессии на по меньшей мере приблизительно 99%.

[001040] В некоторых вариантах осуществления имеет место повышение экспрессии на 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%. В некоторых вариантах осуществления имеет место повышение экспрессии на по меньшей мере приблизительно 65%, приблизительно 70%, приблизительно 75%, приблизительно 80%, приблизительно 85%, приблизительно 90% или приблизительно 95%. В некоторых вариантах осуществления имеет место повышение экспрессии на по меньшей мере приблизительно 75%, приблизительно 80%, приблизительно 85%, приблизительно 90% или приблизительно 95%. В некоторых вариантах осуществления имеет место повышение экспрессии на по меньшей мере приблизительно 80%, приблизительно 85%, приблизительно 90% или приблизительно 95%. В некоторых вариантах осуществления имеет место повышение экспрессии на по меньшей мере приблизительно 85%, приблизительно 90% или приблизительно 95%. В некоторых вариантах осуществления имеет место повышение экспрессии на по меньшей мере приблизительно 80%. В некоторых вариантах осуществления имеет место повышение экспрессии на по меньшей мере приблизительно 85%. В некоторых вариантах осуществления имеет место повышение экспрессии на по меньшей мере приблизительно 90%. В некоторых вариантах осуществления имеет место повышение экспрессии на по меньшей мере приблизительно 95%. В некоторых вариантах осуществления имеет место повышение экспрессии на по меньшей мере приблизительно 99%.

[001041] В некоторых вариантах осуществления временное изменение экспрессии белка индуцируется обработкой TIL факторами транскрипции (TF) и/или другими молекулами, способными временно изменять экспрессию белка в TIL. В некоторых вариантах осуществления безвекторная микрофлюидная платформа SQZ используется для внутриклеточной доставки факторов транскрипции (TF) и/или других молекул, способных временно изменять экспрессию белка. Такие методы, демонстрирующие возможность доставлять белки, включая факторы транскрипции, во множество первичных клеток 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), были описаны; см., например, публикации международных патентных заявок WO 2013/059343A1, WO 2017/008063A1 и WO 2017/123663A1, все из которых включены в настоящий документ посредством ссылки в полном объеме. Такие методы, как описано в публикациях международных патентных заявок WO 2013/059343A1, WO 2017/008063A1 и WO 2017/123663A1, могут быть использованы с настоящим изобретением, чтобы подвергнуть популяцию TIL воздействию факторов транскрипции (TF) и/или других молекул, способных индуцировать временную экспрессию белка, где указанные TF и/или другие молекулы, способные индуцировать временную экспрессию белка, обеспечивают повышенную экспрессию опухолевых антигенов и/или увеличение количества специфичных к опухолевым антигенам Т-клеток в популяции TIL, в результате чего происходит перепрограммирование популяции TIL и увеличение терапевтической эффективности перепрограммированной популяции TIL по

сравнению с неперепрограммированной популяцией TIL. В некоторых вариантах осуществления перепрограммирование приводит к увеличению субпопуляции эффекторных Т-клеток и/или Т-клеток центральной памяти по сравнению с исходной или предшествующей популяцией (т. е. до перепрограммирования) TIL, как описано в настоящем документе.

[001042] В некоторых вариантах осуществления фактор транскрипции (TF) включает, не ограничиваясь перечисленным, TCF-1, NOTCH 1/2 ICD и/или MYB. В некоторых вариантах осуществления фактор транскрипции (TF) представляет собой TCF-1. В некоторых вариантах осуществления фактор транскрипции (TF) представляет собой NOTCH 1/2 ICD. В некоторых вариантах осуществления фактор транскрипции (TF) представляет собой MYB. В некоторых вариантах осуществления фактор транскрипции (TF) вводят с культурой индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (iPSC), такой как коммерчески доступный заменитель сыворотки KNOCKOUT (Gibco/ThermoFisher), чтобы вызвать дополнительное перепрограммирование TIL. В некоторых вариантах осуществления фактор транскрипции (TF) вводят с коктейлем iPSC, чтобы вызвать дополнительное перепрограммирование TIL. В некоторых вариантах осуществления фактор транскрипции (TF) вводят без коктейля iPSC. В некоторых вариантах осуществления перепрограммирование приводит к увеличению процентной доли TSCM. В некоторых вариантах осуществления перепрограммирование приводит к увеличению процентной доли TSCM на 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% TSCM.

[001043] В некоторых вариантах осуществления способ временного изменения экспрессии белка, как описано выше, может быть объединен со способом генетической модификации популяции TIL, который включает этап стабильного включения генов для продукции одного или более белков. В некоторых вариантах осуществления способ включает этап генетической модификации популяции TIL. В отдельных вариантах осуществления способ включает генетическую модификацию первой популяции TIL, второй популяции TIL и/или третьей популяции TIL. В одном из вариантов осуществления способ генетической модификации популяции TIL включает этап ретровирусной трансдукции. В одном из вариантов осуществления способ генетической модификации популяции TIL включает этап лентивирусной трансдукции. Системы лентивирусной трансдукции известны в данной области техники и описаны, например, в Levine, *et al.*, *Proc. Nat'l Acad. Sci.* 2006, *103,* 17372-77; Zufferey, *et al., Nat. Biotechnol.* 1997, *15,* 871-75; Dull, *et al.*, *J. Virology* 1998, *72*, 8463-71 и патенте США № 6627442, содержание каждого из которых включено в настоящий документ посредством ссылки. В одном из вариантов осуществления 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 and Pear, *Cur. Prot. Mol. Biol.* 1996, 9.9.1-9.9.16, содержание которого включено в настоящий документ посредством ссылки. В одном из вариантов осуществления способ генетической модификации популяции TIL включает этап транспозон-опосредованного переноса генов. Системы транспозон-опосредованного переноса генов известны в данной области техники и включают системы, в которых транспозаза представлена как ДНК-вектор экспрессии или как экспрессируемая РНК или белок, так что долговременная экспрессия транспозазы не происходит в трансгенных клетках, например, транспозаза, представленная в виде иРНК (например, иРНК, содержащей кэп и поли-А-хвост). Подходящие системы транспозон-опосредованного переноса генов, включая Tel-подобную транспозазу лососевых (транспозазу SB или Sleeping Beauty), такие как SB10, SB11 и SB100x, и сконструированные ферменты с повышенной ферментативной активностью, описаны, например, в источнике Hackett, *et al.*, *Mol. Therapy* 2010, *18,* 674-83 и патенте США № 6489458, содержание каждого из которых включено в настоящий документ посредством ссылки.

[001044] В некоторых вариантах осуществления временное изменение экспрессии белка представляет собой уменьшение экспрессии, вызванное самодоставляющейся интерферирующей РНК (sd-РНК), которая представляет собой химически синтезированный асимметричный дуплекс из миРНК с высоким процентом замен 2'-OH (обычно фтором или -OCH_3), который содержит антисмысловую (направляющую) цепь из 20 нуклеотидов и смысловую (пассажирскую) цепь из 13-15 оснований, конъюгированных с холестерином на его 3'-конце с помощью тетраэтиленгликолевого линкера (TEG). В некоторых вариантах осуществления способ включает временное изменение экспрессии белка в популяции TIL, включающее использование самодоставляющейся интерферирующей РНК (sd-РНК), которая представляет собой химически синтезированный асимметричный дуплекс из миРНК с высоким процентом замен 2'-OH (обычно фтором или -OCH_3), который содержит антисмысловую (направляющую) цепь из 20 нуклеотидов и смысловую (пассажирскую) цепь из 13-15 оснований, конъюгированных с холестерином на его 3'-конце с помощью тетраэтиленгликолевого линкера (TEG). Способы применения sd-РНК описаны в источниках Khvorova and Watts, *Nat. Biotechnol.* 2017, *35,* 238-248; Byrne, *et al.*, *J. Ocul. Pharmacol. Ther.* 2013, *29,* 855-864; и Ligtenberg, *et al.*, *Mol. Therapy,* 2018, в печати, содержание которых включено в настоящий документ посредством ссылки. В одном из вариантов осуществления доставка sd-РНК в популяцию TIL осуществляется без использования электропорации, SQZ или других методов, вместо этого используют период от 1 до 3 дней, в течение которого популяция TIL подвергается воздействию sd-РНК в концентрации 1 мкМ/10000 TIL в среде. В некоторых вариантах осуществления способ включает доставку sd-РНК в популяцию TIL, включающую воздействие на популяцию TIL с помощью sd-РНК в концентрации 1 мкМ/10000 TIL в среде в течение периода от 1 до 3 дней. В одном из вариантов осуществления доставка sd-РНК в популяцию TIL осуществляется с помощью периода от 1 до 3 дней, в течение которого

популяция TIL подвергается воздействию sd-РНК в концентрации 10 мкМ/10000 TIL в среде. В одном из вариантов осуществления доставка sd-РНК в популяцию TIL осуществляется с помощью периода от 1 до 3 дней, в течение которого популяция TIL подвергается воздействию sd-РНК в концентрации 50 мкМ/10000 TIL в среде. В одном из вариантов осуществления доставка sd-РНК в популяцию TIL осуществляется с помощью периода от 1 до 3 дней, в течение которого популяция TIL подвергается воздействию sd-РНК в концентрации от 0,1 мкМ/10000 TIL до 50 мкМ/10000 TIL в среде. В одном из вариантов осуществления доставка sd-РНК в популяцию TIL осуществляется с помощью периода от 1 до 3 дней, в течение которого популяция TIL подвергается воздействию sd-РНК в концентрации от 0,1 мкМ/10000 TIL до 50 мкМ/10000 TIL в среде, где воздействие с помощью sd-РНК проводят два, три, четыре или пять раз путем добавления в среду свежей sd-РНК. Другие подходящие процессы описаны, например, в публикациях заявок на патент США US 2011/0039914 A1, US 2013/0131141 A1 и US 2013/0131142 A1, а также в патенте США № 9080171, содержание которых включено в настоящий документ посредством ссылки.

[001045] В некоторых вариантах осуществления sd-РНК вставляют в популяцию TIL во время производства. В некоторых вариантах осуществления sd-РНК кодирует РНК, которая интерферирует с NOTCH 1/2 ICD, PD-1, CTLA-4 TIM-3, LAG-3, TIGIT, TGFβ, TGFBR2, цАМФ-зависимой протеинкиназой A (PKA), BAFF BR3, CISH и/или CBLB. В некоторых вариантах осуществления уменьшение экспрессии определяют на основании процента сайленсинга гена, например, по данным проточной цитометрии и/или количественной ПЦР. В некоторых вариантах осуществления имеет место уменьшение экспрессии на 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%. В некоторых вариантах осуществления имеет место уменьшение экспрессии на по меньшей мере приблизительно 65%, приблизительно 70%, приблизительно 75%, приблизительно 80%, приблизительно 85%, приблизительно 90% или приблизительно 95%. В некоторых вариантах осуществления имеет место уменьшение экспрессии на по меньшей мере приблизительно 75%, приблизительно 80%, приблизительно 85%, приблизительно 90% или приблизительно 95%. В некоторых вариантах осуществления имеет место уменьшение экспрессии на по меньшей мере приблизительно 80%, приблизительно 85%, приблизительно 90% или приблизительно 95%. В некоторых вариантах осуществления имеет место уменьшение экспрессии на по меньшей мере приблизительно 85%, приблизительно 90% или приблизительно 95%. В некоторых вариантах осуществления имеет место уменьшение экспрессии на по меньшей мере приблизительно 80%. В некоторых вариантах осуществления имеет место уменьшение экспрессии на по меньшей мере приблизительно 85%. В некоторых вариантах осуществления имеет место

уменьшение экспрессии на по меньшей мере приблизительно 90%. В некоторых вариантах осуществления имеет место уменьшение экспрессии на по меньшей мере приблизительно 95%. В некоторых вариантах осуществления имеет место уменьшение экспрессии на по меньшей мере приблизительно 99%.

[001046] Со способами согласно настоящему изобретению для успешной доставки sd-РНК к TIL может быть использована технология самодоставляющихся РНКи, основанная на химической модификации миРНК, как описано в настоящем документе. Комбинация модификаций основной цепи с асимметричной структурой миРНК и гидрофобным лигандом (см., например, Ligtenberg, *et al.*, *Mol. Therapy,* 2018 и US20160304873) позволяет sd-РНК проникать в культивируемые клетки млекопитающих без использования дополнительных препаратов и методов путем простого добавления к культуральным средам, с использованием стабильность к нуклеазам sd-РНК. Эта стабильность позволяет поддерживать постоянные уровни РНКи-опосредованного снижения активности целевого гена просто за счет поддержания активной концентрации sd-РНК в среде. Не ограничиваясь какой-либо конкретной теорией, полагают, что стабилизация основной цепи sd-РНК обеспечивает длительное уменьшение эффектов экспрессии генов, которое может длиться месяцами в неделящихся клетках.

[001047] В некоторых вариантах осуществления наблюдается эффективность трансфекции TIL более 95% и уменьшение экспрессии мишени с помощью различных специфичных sd-РНК. В некоторых вариантах осуществления sd-РНК, содержащие несколько немодифицированных остатков рибозы, были заменены полностью модифицированными последовательностями для повышения эффективности и/или продолжительности действия РНКи. В некоторых вариантах осуществления уменьшение эффекта экспрессии сохраняется в течение 12 часов, 24 часов, 36 часов, 48 часов, 5 дней, 6 дней, 7 дней или 8 дней, или более. В некоторых вариантах осуществления уменьшение эффекта экспрессии снижается через 10 дней или более после обработки TIL с помощью sd-РНК. В некоторых вариантах осуществления поддерживается уменьшение экспрессии для экспрессии мишени более чем на 70%. В некоторых вариантах осуществления поддерживается уменьшение экспрессии для экспрессии мишени TIL более чем на 70%. В некоторых вариантах осуществления уменьшение экспрессии в пути PD-1/PD-L1 позволяет TIL оказывать более мощное действие in vivo, что в некоторых вариантах осуществления происходит из-за избегания подавляющих эффектов пути PD-1/PD-L1. В некоторых вариантах осуществления уменьшение экспрессии PD-1 с помощью sd-РНК приводит к увеличению пролиферации TIL.

[001048] Малая интерферирующая РНК (миРНК), иногда называемая короткой интерферирующей РНК или сайленсирующей РНК, представляет собой двухцепочечную молекулу РНК, обычно длиной 19-25 пар оснований. миРНК используется в РНК-интерференции (РНКи), где она интерферирует с экспрессией определенных генов с комплементарными нуклеотидными последовательностями.

[001049] Двухцепочечная ДНК (дцРНК) обычно может использоваться для

определения любой молекулы, содержащей пару комплементарных цепей РНК, обычно смысловую (пассажирскую) и антисмысловую (направляющую) цепи, и может включать одноцепочечные выступающие области. Термин «дцРНК», в отличие от миРНК, обычно относится к молекуле-предшественнику, которая включает последовательность молекулы миРНК, которая высвобождается из более крупной молекулы дцРНК под действием систем ферментов расщепления, включая Dicer.

[001050] sd-РНК (самодоставляющаяся РНК) представляет собой новый класс ковалентно модифицированных соединений РНКи, которые не требуют средства доставки для проникновения в клетки и имеют улучшенные фармакологические свойства по сравнению с традиционными миРНК. «Самодоставляющаяся РНК» или «sd-РНК» представляет собой гидрофобно модифицированный гибрид интерферирующей и антисмысловой РНК, продемонстрировавший высокую эффективность *in vitro* в первичных клетках и in vivo при местном введении. Было продемонстрировано устойчивое поглощение и/или сайленсинг в отсутствие токсичности. sd-РНК обычно представляют собой асимметричные химически модифицированные молекулы нуклеиновых кислот с минимальными двухцепочечными областями. Молекулы sd-РНК обычно содержат одноцепочечные области и двухцепочечные области и могут содержать множество различных химических модификаций как в одноцепочечных, так и в двухцепочечных областях молекулы. Кроме того, молекулы sd-РНК могут быть присоединены к гидрофобному конъюгату, такому как обычная и усовершенствованная молекула стеринового типа, как описано в настоящем документе. sd-РНК и связанные с ними способы получения таких sd-РНК также были подробно описаны, например, в US20160304873, WO2010033246, WO2017070151, WO2009102427, WO2011119887, WO2010033247A2, WO2009045457, WO2011119852, все из которых включены в настоящий документ посредством ссылок. Для оптимизации структуры, химического состава sd-РНК, положения нацеливания, предпочтений в последовательности и т. п. был разработан запатентованный алгоритм, который используется для прогнозирования активности sd-РНК (см., например, US 20160304873). На основе этих анализов функциональные последовательности sd-РНК были в общем определены как вызывающие более чем 70% снижение экспрессии в концентрации 1 мкМ с вероятностью более 40%.

[001051] В некоторых вариантах осуществления последовательности sd-РНК, используемые в изобретении, демонстрируют снижение экспрессии целевого гена на 70%. В некоторых вариантах осуществления последовательности sd-РНК, используемые в изобретении, демонстрируют снижение экспрессии целевого гена на 75%. В некоторых вариантах осуществления последовательности sd-РНК, используемые в изобретении, демонстрируют снижение экспрессии целевого гена на 80%. В некоторых вариантах осуществления последовательности sd-РНК, используемые в изобретении, демонстрируют снижение экспрессии целевого гена на 85%. В некоторых вариантах осуществления последовательности sd-РНК, используемые в изобретении, демонстрируют снижение экспрессии целевого гена на 90%. В некоторых вариантах осуществления

последовательности sd-РНК, используемые в изобретении, демонстрируют снижение экспрессии целевого гена на 95%. В некоторых вариантах осуществления последовательности sd-РНК, используемые в изобретении, демонстрируют снижение экспрессии целевого гена на 99%. В некоторых вариантах осуществления последовательности sd-РНК, используемые в изобретении, демонстрируют снижение экспрессии целевого гена при доставке в концентрации от приблизительно 0,25 мкМ до приблизительно 4 мкМ. В некоторых вариантах осуществления последовательности sd-РНК, используемые в изобретении, демонстрируют снижение экспрессии целевого гена при доставке в концентрации 0,25 мкМ. В некоторых вариантах осуществления последовательности sd-РНК, используемые в изобретении, демонстрируют снижение экспрессии целевого гена при доставке в концентрации 0,5 мкМ. В некоторых вариантах осуществления последовательности sd-РНК, используемые в изобретении, демонстрируют снижение экспрессии целевого гена при доставке в концентрации 0,75 мкМ. В некоторых вариантах осуществления последовательности sd-РНК, используемые в изобретении, демонстрируют снижение экспрессии целевого гена при доставке в концентрации 1,0 мкМ. В некоторых вариантах осуществления последовательности sd-РНК, используемые в изобретении, демонстрируют снижение экспрессии целевого гена при доставке в концентрации 1,25 мкМ. В некоторых вариантах осуществления последовательности sd-РНК, используемые в изобретении, демонстрируют снижение экспрессии целевого гена при доставке в концентрации 1,5 мкМ. В некоторых вариантах осуществления последовательности sd-РНК, используемые в изобретении, демонстрируют снижение экспрессии целевого гена при доставке в концентрации 1,75 мкМ. В некоторых вариантах осуществления последовательности sd-РНК, используемые в изобретении, демонстрируют снижение экспрессии целевого гена при доставке в концентрации 2,0 мкМ. В некоторых вариантах осуществления последовательности sd-РНК, используемые в изобретении, демонстрируют снижение экспрессии целевого гена при доставке в концентрации 2,25 мкМ. В некоторых вариантах осуществления последовательности sd-РНК, используемые в изобретении, демонстрируют снижение экспрессии целевого гена при доставке в концентрации 2,5 мкМ. В некоторых вариантах осуществления последовательности sd-РНК, используемые в изобретении, демонстрируют снижение экспрессии целевого гена при доставке в концентрации 2,75 мкМ. В некоторых вариантах осуществления последовательности sd-РНК, используемые в изобретении, демонстрируют снижение экспрессии целевого гена при доставке в концентрации 3,0 мкМ. В некоторых вариантах осуществления последовательности sd-РНК, используемые в изобретении, демонстрируют снижение экспрессии целевого гена при доставке в концентрации 3,25 мкМ. В некоторых вариантах осуществления последовательности sd-РНК, используемые в изобретении, демонстрируют снижение экспрессии целевого гена при доставке в концентрации 3,5 мкМ. В некоторых вариантах осуществления последовательности sd-РНК, используемые в изобретении, демонстрируют снижение экспрессии целевого гена при доставке в концентрации 3,75 мкМ. В некоторых вариантах осуществления последовательности sd-

РНК, используемые в изобретении, демонстрируют снижение экспрессии целевого гена при доставке в концентрации 4,0 мкМ.

[001052] В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотидные агенты содержат одну или более модификаций для повышения стабильности и/или эффективности терапевтического агента и для обеспечения эффективной доставки олигонуклеотида в клетки или ткань, подлежащие лечению. Такие модификации могут включать 2'-О-метил-модификацию, 2'-О-фтор-модификацию, дитиофосфатную модификацию, 2'-F-модифицированный нуклеотид, 2'-О-метил модифицированный и/или 2'-дезоксинуклеотид. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид модифицирован для включения одной или более гидрофобных модификаций, включая, например, стерин, холестерин, витамин D, нафтил, изобутил, бензил, индол, триптофан и/или фенил. В дополнительном частном варианте осуществления химически модифицированные нуклеотиды представляют собой комбинацию тиофосфатов, 2'-О-метила, 2'-дезокси, гидрофобных модификаций и тиофосфатов. В некоторых вариантах осуществления сахара могут быть модифицированы, и модифицированные сахара могут включать, не ограничиваясь перечисленным, D-рибозу, 2'-О-алкил (включая 2'-О-метил и 2'-О-этил), т. е. 2'-алкокси, 2'-амино, 2'-S-алкил, 2'-галоген (включая 2'-фтор), Т-метоксиэтокси, 2'-аллилокси (-$OCH_2CH{=}CH_2$), 2'-пропаргил, 2'-пропил, этинил, этенил, пропенил, циано и т. п. В одном из вариантов осуществления сахарный фрагмент может представлять собой гексозу и быть включен в олигонуклеотид, как описано (Augustyns, K., et al., Nucl. Acids. Res. 18:4711 (1992)).

[001053] В некоторых вариантах осуществления двухцепочечный олигонуклеотид согласно изобретению является двухцепочечным по всей своей длине, т. е. не имеет выступающей одноцепочечной последовательности на любом из концов молекулы, т. е. имеет тупой конец. В некоторых вариантах осуществления отдельные молекулы нуклеиновой кислоты могут иметь разную длину. Другими словами, двухцепочечный олигонуклеотид согласно изобретению не является двухцепочечным по всей своей длине. Например, когда используются две отдельные молекулы нуклеиновой кислоты, одна из молекул, например, первая молекула, содержащая антисмысловую последовательность, может быть длиннее, чем вторая молекула, гибридизирующаяся с ней (оставляя часть молекулы одноцепочечной). В некоторых вариантах осуществления, когда используется одна молекула нуклеиновой кислоты, часть молекулы на любом из концов может оставаться одноцепочечной.

[001054] В некоторых вариантах осуществления двухцепочечный олигонуклеотид согласно изобретению содержит ошибки спаривания и/или петли или выпетливания, но является двухцепочечным по меньшей мере приблизительно на 70% длины олигонуклеотида. В некоторых вариантах осуществления двухцепочечный олигонуклеотид согласно изобретению является двухцепочечным по меньшей мере приблизительно на 80% длины олигонуклеотида. В еще одном варианте осуществления двухцепочечный олигонуклеотид согласно изобретению является двухцепочечным по меньшей мере

приблизительно на 90%-95% длины олигонуклеотида. В некоторых вариантах осуществления двухцепочечный олигонуклеотид согласно изобретению является двухцепочечным по меньшей мере приблизительно на 96%-98% длины олигонуклеотида. В некоторых вариантах осуществления двухцепочечный олигонуклеотид согласно изобретению содержит по меньшей мере или вплоть до 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 или 15 ошибок спаривания.

[001055] В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид можно быть существенно защищен от нуклеаз, например, путем модификации 3'- или 5'-связей (например, патент США № 5849902 и WO 98/13526). Например, олигонуклеотиды могут быть сделаны устойчивыми путем включения «блокирующей группы». Термин «блокирующая группа» в контексте настоящего документа относится к заместителям (например, отличным от групп ОН), которые могут быть присоединены к олигонуклеотидам или нуклеомономерам в качестве защитных групп или групп связывания для синтеза (например, FITC, пропил (CH_2-CH_2-CH_3), гликоль (-O-CH_2-CH_2-O-) фосфат ($PO_3^{2"}$), гидрофосфонат или амидофосфит). «Блокирующие группы» могут также включать «концевые блокирующие группы» или «группы, блокирующие экзонуклеазу», которые защищают 5'- и 3'-концы олигонуклеотида, включая модифицированные нуклеотиды и ненуклеотидные структуры, устойчивые к экзонуклеазам.

[001056] В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере часть смежных полинуклеотидов в sd-РНК связаны замещающей связью, например, дитиофосфатной связью.

[001057] В некоторых вариантах осуществления химическая модификация может привести 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 увеличениям клеточного поглощения. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один из остатков C или U включает гидрофобную модификацию. В некоторых вариантах осуществления множество C и U содержат гидрофобную модификацию. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 10%, 15%, 20%, 30%, 40%, 50%, 55%, 60% 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или по меньшей мере 95% C и U могут содержать гидрофобную модификацию. В некоторых вариантах осуществления все C и U содержат гидрофобную модификацию.

[001058] В некоторых вариантах осуществления sd-РНК или sd-rxРНК демонстрируют повышенное эндосомальное высвобождение молекул sd-rxРНК за счет включения протонируемых аминов. В некоторых вариантах осуществления протонируемые амины включены в смысловую цепь (в часть молекулы, которая отбрасывается после загрузки RISC (РНК-индуцируемый сайленсинг-комплекс)). В некоторых вариантах осуществления соединения sd-РНК согласно 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. В некоторых вариантах осуществления используется одноцепочечная область из 6 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления одноцепочечная область sd-РНК содержит 2-12 тиофосфатных межнуклеотидных связей (называемых тиофосфатными модификациями). В некоторых вариантах осуществления используется 6-8 тиофосфатных межнуклеотидных связей. В некоторых вариантах осуществления соединения sd-РНК согласно изобретению также включают уникальный паттерн химической модификации, который обеспечивает стабильность и совместим с входом в RISC.

[001059] Направляющая цепь, например, также может быть модифицирована посредством любой химической модификации, которая подтверждает стабильность, не препятствуя входу в RISC. В некоторых вариантах осуществления паттерн химической модификации в направляющей цепи включает большинство нуклеотидов C и U, которые являются 2'-F-модифицированными, причем 5'-конец является фосфорилированным.

[001060] В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 30% нуклеотидов в sd-РНК или sd-rxРНК являются модифицированными. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 30%, 31%, 32%, 33%, 34%, 35%, 36%, 37%, 38%, 39%, 40%, 41%, 42%, 43%, 44%, 45%, 46%, 47%, 48%, 49%, 50%, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% нуклеотидов в sd-РНК или sd-rxРНК являются модифицированными. В некоторых вариантах осуществления 100% нуклеотидов в sd-РНК или sd-rxРНК являются модифицированными.

[001061] В некоторых вариантах осуществления молекулы sd-РНК имеют минимальные двухцепочечные области. В некоторых вариантах осуществления область молекулы, которая является двухцепочечной, имеет длину от 8 до 15 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления область молекулы, которая является двухцепочечной, имеет длину 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 или 15 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления двухцепочечная область имеет длину 13 нуклеотидов. Между направляющей и пассажирской цепями может иметь место 100% комплементарность, либо между направляющей и пассажирской цепями может присутствовать одна или более ошибок спаривания. В некоторых вариантах осуществления на одном конце двухцепочечной молекулы молекула имеет либо тупой конец, либо однонуклеотидный выступ. Одноцепочечная область молекулы в некоторых вариантах осуществления имеет длину от 4 до 12 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления одноцепочечная область может иметь длину 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления одноцепочечная область также может иметь длину менее 4 или более 12 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления одноцепочечная область имеет длину 6 или 7 нуклеотидов.

[001062] В некоторых вариантах осуществления молекулы sd-РНК обладают повышенной стабильностью. В некоторых случаях химически модифицированная

молекула sd-РНК или sd-rxРНК имеет период полужизни в среде, который превышает 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, или составляет более 24 часов, включая любые промежуточные значения. В некоторых вариантах осуществления sd-rxРНК имеет период полужизни в среде, превышающий 12 часов.

[001063] В некоторых вариантах осуществления sd-РНК оптимизирована для повышения эффективности и/или снижения токсичности. В некоторых вариантах осуществления количество нуклеотидов в направляющей и/или пассажирской цепи, и/или количество тиофосфатных модификаций в направляющей и/или пассажирской цепи может в некоторых аспектах влиять на эффективность молекулы РНК, тогда как замена 2'-фтор-модификаций (2'F) 2'-О-метил-модификациями (2'OMe) может в некоторых аспектах влиять на токсичность молекулы. В некоторых вариантах осуществления ожидается, что уменьшение содержания 2'F в молекуле снизит токсичность молекулы. В некоторых вариантах осуществления количество тиофосфатных модификаций в молекуле РНК может влиять на поглощение молекулы клеткой, например, на эффективность пассивного поглощения молекулы клеткой. В некоторых вариантах осуществления sd-РНК не имеет 2'F-модификации и, тем не менее, характеризуется равной эффективностью в отношении клеточного поглощения и проникновения в ткань.

[001064] В некоторых вариантах осуществления направляющая цепь имеет длину приблизительно 18-19 нуклеотидов и имеет приблизительно 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, которые являются фосфат-модифицированными. Направляющая цепь может содержать одну или более модификаций, придающих повышенную стабильность, не мешая входу в RISC. Фосфат-модифицированные нуклеотиды, такие как тиофосфат-модифицированные нуклеотиды, могут находиться на 3'-конце, 5'-конце или быть распределены по направляющей цепи. В некоторых вариантах осуществления 3'-концевые 10 нуклеотидов направляющей цепи содержат 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 тиофосфат-модифицированных нуклеотидов. Направляющая цепь также может содержать 2'F- и/или 2'OMe-модификации, которые могут быть расположены по всей длине молекулы. В некоторых вариантах осуществления нуклеотид в положении одной направляющей цепи (нуклеотид в самом крайнем 5'-положении направляющей цепи) является 2'OMe-модифицированным и/или фосфорилированным. 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 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 из 19 нуклеотидов (или соответствующих положениях в направляющей цепи другой длины) могут быть 2'OMe-модифицированы. В некоторых вариантах осуществления нуклеотид в самом крайнем 3'-положении направляющей цепи не является модифицированным. В отдельных вариантах осуществления большая часть C и U в направляющей цепи является 2'F-

модифицированной, а 5'-конец направляющей цепи является фосфорилированным. В других вариантах осуществления положение 1 и C или U в положениях 11-18 являются 2'OMe-модифицированными, а 5'-конец направляющей цепи является фосфорилированным. В других вариантах осуществления положение 1 и C или U в положениях 11-18 являются 2'OMe-модифицированными, 5'-конец направляющей цепи является фосфорилированным и C или U в положении 2-10 являются 2'F-модифицированными.

[001065] Технология самодоставляющейся РНКи обеспечивает способ прямой трансфекции клеток агентом РНКи без необходимости в дополнительных препаратах или методах. Способность трансфицировать трудно трансфицируемые клеточные линии, высокая активность *in vivo* и простота использования являются характеристиками композиций и способов, которые обладают значительными функциональными преимуществами по сравнению с традиционными методами на основе миРНК, и поэтому способы на основе sd-РНК используются в нескольких вариантах осуществления, относящихся к способам уменьшения экспрессии целевого гена в TIL согласно настоящему изобретению. Способы на основе sd-РНКи позволяют осуществлять прямую доставку химически синтезированных соединений в широкий спектр первичных клеток и тканей, как *ex vivo*, так и *in vivo*. Sd-РНК, описанные в некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, коммерчески доступны от Advirna LLC, Вустер, Массачусетс, США.

[001066] Sd-РНК формируются в виде гидрофобно-модифицированных гибридных структур миРНК-антисмыслового олигонуклеотида и раскрыты, например, в источнике Byrne et al., December 2013, J. Ocular Pharmacology and Therapeutics, 29(10): 855-864, включенном в настоящий документ посредством ссылки в полном объеме.

[001067] В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотиды sd-РНК могут быть доставлены в TIL, описанные в настоящем документе, с использованием стерильной электропорации. В некоторых вариантах осуществления способ включает стерильную электропорацию популяции TIL для доставки олигонуклеотидов sd-РНК.

[001068] В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотиды могут быть доставлены в клетки в комбинации с трансмембранной системой доставки. В некоторых вариантах осуществления эта трансмембранная система доставки включает липиды, вирусные векторы и т. п. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотидный агент представляет собой самодоставляющийся агент РНКи, не требующий каких-либо агентов для доставки. В некоторых вариантах осуществления способ включает применение трансмембранной системы доставки для доставки олигонуклеотидов sd-РНК к популяции TIL.

[001069] Олигонуклеотиды и композиции олигонуклеотидов контактируют с (например, приводят в контакт с, также называется в настоящем документе введением или доставкой в) TIL, описанными в настоящем документе, и захватываются ими, в том числе посредством пассивного поглощения TIL. Sd-РНК может быть добавлена к TIL, как описано в настоящем документе, во время первой экспансии, например, этапа B, после первой

экспансии, например, во время этапа C, до или во время второй экспансии, например, до или во время этапа D, после этапа D и перед сбором на этапе E, во время или после сбора на этапе F, до или во время приготовления готового препарата и/или переноса в пакет для инфузии на этапе F, а также перед любым необязательным этапом криоконсервации на этапе F. Более того, sd-РНК может быть добавлена после размораживания после любого этапа криоконсервации на этапе F. В одном из вариантов осуществления одна или более sd-РНК, нацеленных на гены, как описано в настоящем документе, включая PD-1, LAG-3, TIM-3, CISH и CBLB, могут быть добавлены в среду для культивирования клеток, содержащую TIL и другие агенты, в концентрациях, выбранных из группы, состоящий из от 100 нМ до 20 мМ, от 200 нМ до 10 мМ, от 500 нМ до 1 мМ, от 1 мкМ до 100 мкМ и от 1 мкМ до 100 мкМ. В одном из вариантов осуществления одна или более sd-РНК, нацеленных на гены, как описано в настоящем документе, включая PD-1, LAG-3, TIM-3, CISH и CBLB, могут быть добавлены в среду для культивирования клеток, содержащую TIL и другие агенты, в количествах, выбранных из группы, состоящей из 0,1 мкМ sd-РНК/10 000 TIL/100 мкл среды, 0,5 мкМ sd-РНК/10 000 TIL /100 мкл среды, 0,75 мкМ sd-РНК/10 000 TIL /100 мкл среды, 1 мкМ sd-РНК/10 000 TIL /100 мкл среды, 1,25 мкМ sd-РНК/10 000 TIL /100 мкл среды, 1,5 мкМ sd-РНК/10 000 TIL /100 мкл среды, 2 мкМ sd-РНК/10 000 TIL /100 мкл среды, 5 мкМ sd-РНК/10 000 TIL /100 мкл среды или 10 мкМ sd-РНК/10 000 TIL /100 мкл среды. В одном из вариантов осуществления одна или более sd-РНК, нацеленных на гены, как описано в настоящем документе, включая PD-1, LAG-3, TIM-3, CISH и CBLB, могут быть добавлены к культурам TIL во время этапов pre-REP или REP два раза в день, один раз в день, каждые два дня, каждые три дня, каждые четыре дня, каждые пять дней, каждые шесть дней или каждые семь дней.

[001070] Композиции олигонуклеотидов согласно изобретению, включая sd-РНК, могут быть приведены в контакт с TIL, как описано в настоящем документе, во время процесса экспансии, например, путем растворения sd-РНК в высоких концентрациях в средах для культивирования клеток и обеспечения достаточного времени для пассивного поглощения. В отдельных вариантах осуществления способ согласно настоящему изобретению включает приведение популяции TIL в контакт с композицией олигонуклеотидов, как описано в настоящем документе. В отдельных вариантах осуществления способ включает растворение олигонуклеотида, например, sd-РНК, в среде для культивирования клеток и приведение среды для культивирования клеток в контакт с популяцией TIL. TIL могут представлять собой первую популяцию, вторую популяцию и/или третью популяцию, как описано в настоящем документе.

[001071] В некоторых вариантах осуществления доставка олигонуклеотидов в клетки может быть усилена подходящими методами, признанными в данной области техники, включая фосфат кальция, ДМСО, глицерин или декстран, электропорацию или трансфекцию, например, с использованием катионных, анионных или нейтральных липидных композиций или липосом с использованием 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).

[001072] В некоторых вариантах осуществления для уменьшения экспрессии целевого гена используется более одной sd-РНК. В некоторых вариантах осуществления одна или более sd-РНК, нацеленных на PD-1, TIM-3, CBLB, LAG3 и/или CISH, используются вместе. В некоторых вариантах осуществления sd-РНК к PD-1 используется с одним или более из TIM-3, CBLB, LAG3 и/или CISH, чтобы уменьшить экспрессию более чем одного целевого гена. В некоторых вариантах осуществления sd-РНК к LAG3 используется в комбинации с sd-РНК, нацеленной на CISH, для уменьшения экспрессии генов для обеих мишеней. В некоторых вариантах осуществления sd-РНК, нацеленные на один или более из PD-1, TIM-3, CBLB, LAG3 и/или CISH, согласно настоящему документу, коммерчески доступны от Advirna LLC, Вустер, Массачусетс, США.

[001073] В некоторых вариантах осуществления sd-РНК нацелена на ген, выбранный из группы, состоящей из PD-1, LAG3, TIM3, CTLA-4, TIGIT, CISH, TGFβR2, PKA, CBLB, BAFF (BR3), и их комбинаций. В некоторых вариантах осуществления sd-РНК нацелена на ген, выбранный из группы, состоящей из PD-1, LAG3, TIM3, CTLA-4, TIGIT, CISH, TGFβR2, PKA, CBLB, BAFF (BR3), и их комбинаций. В некоторых вариантах осуществления одна sd-РНК нацелена на PD-1, а другая sd-РНК нацелена на ген, выбранный из группы, состоящей из LAG3, TIM3, CTLA-4, TIGIT, CISH, TGFβR2, PKA, CBLB, BAFF (BR3), и их комбинаций. В некоторых вариантах осуществления sd-РНК нацелена на ген, выбранный из PD-1, LAG-3, CISH, CBLB, TIM3 и их комбинаций. В некоторых вариантах осуществления sd-РНК нацелена на ген, выбранный из PD-1 и одного из LAG3, CISH, CBLB, TIM3 и их комбинаций. В некоторых вариантах осуществления одна sd-РНК нацелена на PD-1, и одна sd-РНК нацелена на LAG3. В некоторых вариантах осуществления одна sd-РНК нацелена на PD-1, и одна sd-РНК нацелена на CISH. В некоторых вариантах осуществления одна sd-РНК нацелена на PD-1, и одна sd-РНК нацелена на CBLB. В некоторых вариантах осуществления одна sd-РНК нацелена на LAG3, и одна sd-РНК нацелена на CISH. В некоторых вариантах осуществления одна sd-РНК нацелена на LAG3, и одна sd-РНК нацелена на CBLB. В некоторых вариантах осуществления одна sd-РНК нацелена на CISH, и одна sd-РНК нацелена на CBLB. В некоторых вариантах осуществления одна sd-РНК нацелена на TIM3, и одна sd-РНК нацелена на PD-1. В некоторых вариантах осуществления одна sd-РНК нацелена на TIM3, и одна sd-РНК нацелена на LAG3. В некоторых вариантах осуществления одна sd-РНК нацелена на TIM3, и одна sd-РНК нацелена на CISH. В некоторых вариантах осуществления одна sd-РНК нацелена на TIM3, и одна sd-РНК нацелена на CBLB.

[001074] Как обсуждалось выше, варианты осуществления настоящего изобретения обеспечивают опухоль-инфильтрирующие лимфоциты (TIL), которые были генетически модифицированы посредством редактирования генов для усиления их терапевтического эффекта. Варианты осуществления настоящего изобретения включают генетическое редактирование посредством вставки нуклеотидов (РНК или ДНК) в популяцию TIL как для стимулирования экспрессии одного или более белков, так и для ингибирования

экспрессии одного или более белков, а также их комбинаций. Варианты осуществления настоящего изобретения также обеспечивают способы экспансии TIL в терапевтическую популяцию, где указанные способы включают редактирование генов TIL. Существует несколько технологий редактирования генов, которые могут быть использованы для генетической модификации популяции TIL, которые подходят для использования в соответствии с настоящим изобретением.

[001075] В некоторых вариантах осуществления способ генетической модификации популяции TIL включает этап стабильного включения генов для продукции одного или более белков. В одном из вариантов осуществления способ генетической модификации популяции TIL включает этап ретровирусной трансдукции. В одном из вариантов осуществления способ генетической модификации популяции TIL включает этап лентивирусной трансдукции. Системы лентивирусной трансдукции известны в данной области техники и описаны, например, в Levine, *et al.*, *Proc. Nat'l Acad. Sci.* 2006, *103,* 17372-77; Zufferey, *et al., Nat. Biotechnol.* 1997, *15,* 871-75; Dull, *et al.*, *J. Virology* 1998, *72*, 8463-71 и патенте США № 6627442, содержание каждого из которых включено в настоящий документ посредством ссылки. В одном из вариантов осуществления 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 and Pear, *Cur. Prot. Mol. Biol.* 1996, 9.9.1-9.9.16, содержание которого включено в настоящий документ посредством ссылки. В одном из вариантов осуществления способ генетической модификации популяции TIL включает этап транспозон-опосредованного переноса генов. Системы транспозон-опосредованного переноса генов известны в данной области техники и включают системы, в которых транспозаза представлена как ДНК-вектор экспрессии или как экспрессируемая РНК или белок, так что долговременная экспрессия транспозазы не происходит в трансгенных клетках, например, транспозаза, представленная в виде иРНК (например, иРНК, содержащей кэп и поли-А-хвост). Подходящие системы транспозон-опосредованного переноса генов, включая Tel-подобную транспозазу лососевых (транспозазу SB или Sleeping Beauty), такие как SB10, SB11 и SB100x, и сконструированные ферменты с повышенной ферментативной активностью, описаны, например, в источнике Hackett, *et al.*, *Mol. Therapy* 2010, *18,* 674-83 и патенте США № 6489458, содержание каждого из которых включено в настоящий документ посредством ссылки.

[001076] В одном из вариантов осуществления способ включает способ генетической модификации популяции TIL, например первой популяции, второй популяции и/или третьей популяции, как описано в настоящем документе. В одном из вариантов осуществления способ генетической модификации популяции TIL включает этап стабильного включения генов для продукции или ингибирования (например, сайленсинга) одного или более белков. В одном из вариантов осуществления способ генетической модификации популяции TIL включает этап электропорации. Способы электропорации известны в данной области техники и описаны, например, в источнике Tsong, *Biophys. J.*

1991, *60,* 297-306 и публикации заявки на патент США № 2014/0227237 A1, содержание каждого из которых включены в настоящий документ посредством ссылки. Могут быть использованы другие способы 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 в настоящий документ посредством ссылки. В одном из вариантов осуществления способ электропорации представляет собой способ стерильной электропорации. В одном из вариантов осуществления способ электропорации представляет собой способ импульсной электропорации. В одном из вариантов осуществления способ электропорации представляет собой способ импульсной электропорации, включающий этапы воздействия на TIL импульсными электрическими полями для изменения, управления или создания определенных и контролируемых, постоянных или временных изменений в TIL, включающего этап применения последовательности из по меньшей мере трех одиночных, управляемых оператором, независимо запрограммированных электрических импульсов постоянного тока, имеющих напряженности поля, равные или превышающие 100 В/см, к TIL, где последовательность из по меньшей мере трех электрических импульсов постоянного тока обладает одной, двумя или тремя 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 для первого набора из двух из по меньшей мере трех импульсов отличается от второго интервала между импульсами для второго набора из двух из по меньшей мере трех импульсов. В одном из вариантов осуществления способ электропорации представляет собой способ импульсной электропорации, включающий этапы воздействия на TIL импульсными электрическими полями для изменения, управления или создания определенных и контролируемых, постоянных или временных изменений в TIL, включающего этап применения последовательности из по меньшей мере трех одиночных, управляемых оператором, независимо запрограммированных электрических импульсов постоянного тока, имеющих напряженности поля, равные или превышающие 100 В/см, к TIL, где по меньшей мере два из по меньшей мере трех импульсов отличаются друг от друга амплитудой импульса. В одном из вариантов осуществления способ электропорации представляет собой способ импульсной электропорации, включающий этапы воздействия на TIL импульсными электрическими полями для изменения, управления или создания определенных и контролируемых, постоянных или временных изменений в TIL, включающего этап применения последовательности из по меньшей мере трех одиночных, управляемых оператором, независимо запрограммированных электрических импульсов постоянного тока, имеющих напряженности поля, равные или превышающие 100 В/см, к TIL, где по меньшей мере два из по меньшей мере трех импульсов отличаются друг от друга шириной импульса. В одном из вариантов осуществления способ электропорации представляет собой способ импульсной электропорации, включающий этапы воздействия

на TIL импульсными электрическими полями для изменения, управления или создания определенных и контролируемых, постоянных или временных изменений в TIL, включающего этап применения последовательности из по меньшей мере трех одиночных, управляемых оператором, независимо запрограммированных электрических импульсов постоянного тока, имеющих напряженности поля, равные или превышающие 100 В/см, к TIL, где первый интервал между импульсами для первого набора из двух из по меньшей мере трех импульсов отличается от второго интервала между импульсами для второго набора из двух из по меньшей мере трех импульсов. В одном из вариантов осуществления способ электропорации представляет собой способ импульсной электропорации, включающий этапы воздействия на TIL импульсными электрическими полями для индукции образования пор в TIL, включающего этап применения последовательности из по меньшей мере трех электрических импульсов постоянного тока, имеющих напряженности поля, равные или превышающие 100 В/см, к TIL, где последовательность из по меньшей мере трех электрических импульсов постоянного тока обладает одной, двумя или тремя 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 для первого набора из двух из по меньшей мере трех импульсов отличается от второго интервала между импульсами для второго набора из двух из по меньшей мере трех импульсов, так что индуцированные поры сохраняются в течение относительно длительного периода времени, и так что поддерживается жизнеспособность TIL. В одном из вариантов осуществления способ генетической модификации популяции TIL включает этап кальций-фосфатной трансфекции. Способы кальций-фосфатной трансфекции (осаждение ДНК фосфатом кальция, покрытие клеточной поверхности и эндоцитоз) известны в данной области техники и описаны в Graham and van der Eb, *Virology* 1973, *52,* 456-467; Wigler, *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1979, *76,* 1373-1376; и Chen and Okayarea, *Mol. Cell. Biol.* 1987, *7,* 2745-2752; и в патенте США № 5593875, содержание каждого из которых включено в настоящий документ посредством ссылки. В одном из вариантов осуществления способ генетической модификации популяции TIL включает этап липосомальной трансфекции. Способы липосомальной трансфекции, такие как способы, в которых используется липосомальной состав 1:1 (мас./мас.) катионного липида *N*-[1-(2,3-диолеилокси)пропил]-*n,* *n*,*n*-триметиламмонийхлорида (DOTMA) и диолеоилфосфотидилэтаноламина (DOPE) в фильтрованной воде, известны в данной области техники и описаны в Rose, *et al.*, *Biotechniques* 1991, *10,* 520-525 и Felgner, *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1987, *84,* 7413-7417, и в патентах США №№ 5279833, 5908635, 6056938, 6110490, 6534484 и 7687070, содержание каждого из которых включено в настоящий документ посредством ссылки. В одном из вариантов осуществления способ генетической модификации популяции TIL включает этап трансфекции с использованием способов, описанных в патентах США №№ 5766902, 6025337, 6410517, 6475994 и 7189705, содержание каждого из которых включено в настоящий документ посредством ссылки. TIL

могут представлять собой первую популяцию, вторую популяцию и/или третью популяцию TIL, как описано в настоящем документе.

[001077] Согласно одному из вариантов осуществления 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 обеспечивают точное редактирование генома путем введения разрывов в определенные геномные локусы, т. е. они основываются на распознавании специфической последовательности ДНК в геноме для нацеливания нуклеазного домена в это место и опосредуют образование двухцепочечного разрыва в целевой последовательности. Двухцепочечный разрыв в ДНК впоследствии задействует эндогенный аппарат репарации в сайте разрыва, опосредуя редактирование генома посредством негомологичного соединения концов (NHEJ) или гомологичной репарации (HDR). Таким образом, репарация разрыва может привести к введению инсерционных/делеционных мутаций, которые нарушают (например, вызывают сайленсинг, подавляют или усиливают) продукт целевого гена.

[001078] Основные классы нуклеаз, которые были разработаны для обеспечения сайт-специфического редактирования генома, включают нуклеазы с цинковыми пальцами (ZFN), нуклеазы, подобные активаторам транскрипции (TALEN), и CRISPR-ассоциированные нуклеазы (например, CRISPR/Cas9). Эти нуклеазные системы можно в широком смысле разделить на две категории в зависимости от способа распознавания ДНК: ZFN и TALEN достигают специфического связывания ДНК посредством взаимодействий белок-ДНК, тогда как системы CRISPR, такие как Cas9, нацеливаются на специфические последовательности ДНК с помощью молекулы короткой гидовой РНК, которая образует пары оснований непосредственно с целевой ДНК, и посредством взаимодействий белок-ДНК. См., например, Cox *et al.*, *Nature Medicine,* 2015, Vol. 21, No. 2.

[001079] Неограничивающие примеры методов редактирования генов, которые могут быть использованы в соответствии со способами экспансии TIL согласно настоящему изобретению, включают методы CRISPR, методы TALE и методы ZFN, которые более подробно описаны ниже. Согласно одному из вариантов осуществления способ экспансии TIL в терапевтическую популяцию может быть осуществлен в соответствии с любым из вариантов осуществления способов, описанных в настоящем документе (например, процессом GEN 3), или как описано в PCT/US2017/058610, PCT/US2018/012605 или PCT/US2018/012633, где способ дополнительно включает редактирование генов по меньшей мере части TIL с помощью одного или более из метода CRISPR, метода TALE или метода ZFN, для получения TIL, которые могут обеспечить улучшенный терапевтический эффект. Согласно одному из вариантов осуществления подвергнутые редактированию генов TIL могут быть оценены на предмет улучшенного терапевтического эффекта путем сравнения их с немодифицированными TIL *in vitro*, например, путем оценки эффекторной функции *in vitro*, профилей цитокинов и т. д. по сравнению с немодифицированными TIL. В отдельных вариантах осуществления способ включает редактирование генов популяции

TIL с использованием методов CRISPR, TALE и/или ZFN.

[001080] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения для доставки системы редактирования генов, такой как системы CRISPR, TALEN и ZFN, используют электропорацию. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения система электропорации представляет собой проточную систему электропорации. Примером подходящей проточной системы электропорации, подходящей для применения с некоторыми вариантами осуществления настоящего изобретения, является коммерчески доступная система MaxCyte STX. Существует несколько альтернативных коммерчески доступных инструментов электропорации, которые могут быть подходящими для применения в настоящем изобретении, 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). В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения система электропорации образует закрытую стерильную систему с остальной частью способа экспансии TIL. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения система электропорации представляет собой систему импульсной электропорации, как описано в настоящем документе, и образует закрытую стерильную систему с остальной частью способа экспансии TIL.

[001081] Способ экспансии TIL в терапевтическую популяцию может быть осуществлен в соответствии с любым из вариантов осуществления способов, описанных в настоящем документе (например, процессом GEN 3), или как описано в PCT/US2017/058610, PCT/US2018/012605 или PCT/US2018/012633, где способ дополнительно включает редактирование генов по меньшей мере части TIL с помощью метода CRISPR (например, CRISPR/Cas9 или CRISPR/Cpf1). Согласно частным вариантам осуществления применение метода CRISPR во время процесса экспансии TIL вызывает сайленсинг или уменьшение экспрессии одного или более генов иммунных контрольных точек в по меньшей мере части терапевтической популяции TIL. В качестве альтернативы, применение метода CRISPR во время процесса экспансии TIL вызывает усиление экспрессии одного или более генов иммунных контрольных точек в по меньшей мере части терапевтической популяции TIL.

[001082] CRISPR расшифровывается как «короткие палиндромные повторы, регулярно расположенные группами». Способ применения системы CRISPR для редактирования генов также называется в настоящем документе методом CRISPR. Существует три типа систем CRISPR, которые включают РНК и белки Cas и которые могут быть использованы в соответствии с настоящим изобретением: типы I, II и III. CRISPR II типа (примером является Cas9) является одной из наиболее хорошо охарактеризованных систем.

[001083] Технология CRISPR была адаптирована из естественных защитных механизмов бактерий и архей (домен одноклеточных микроорганизмов). Эти организмы используют РНК из CRISPR и различные белки Cas, включая Cas9, для противодействия

атакам вирусов и других инородных тел путем измельчения и разрушения ДНК чужеродного агента. CRISPR представляет собой специализированную область ДНК с двумя отличительными характеристиками: наличием нуклеотидных повторов и спейсеров. Повторяющиеся последовательности нуклеотидов распределены по всей области CRISPR с короткими сегментами чужеродной ДНК (спейсерами), рассеянными среди повторяющихся последовательностей. В системе CRISPR/Cas II типа спейсеры интегрированы в геномные локусы CRISPR и транскрибируются и процессируются в короткую РНК CRISPR (crРНК). Эти crРНК отжигаются с транс-активирующими crРНК (tracrРНК) и управляют сиквенс-специфичным расщеплением и сайленсингом патогенной ДНК посредством белков Cas. Для распознавания мишени белком Cas9 необходима «затравочная» последовательность в crРНК и последовательность консервативного динуклеотидсодержащего мотива, прилегающего к протоспейсеру (PAM), выше области связывания crРНК. Таким образом, система CRISPR/Cas может быть перенаправлена на расщепление практически любой последовательности ДНК путем изменения конструкции crРНК. CrРНК и tracrРНК в нативной системе могут быть упрощены в единую гидовую РНК (sgРНК) приблизительно из 100 нуклеотидов для использования в генной инженерии. Система CRISPR/Cas может быть напрямую перенесена в клетки человека за счет совместной доставки плазмид, экспрессирующих эндонуклеазу Cas9 и необходимые компоненты crРНК. Для уменьшения ограничений нацеливания можно использовать различные варианты белков Cas (например, ортологи Cas9, такие как Cpf1).

[001084] Неограничивающие примеры генов, которые могут быть подвергнуты сайленсингу или ингибированы вследствие постоянного редактирования генов TIL с помощью метода CRISPR, включают PD-1, CTLA-4, LAG-3, HAVCR2 (TIM-3), Cish, TGFβ, PKA, CBL-B, PPP2CA, PPP2CB, PTPN6, PTPN22, PDCD1, BTLA, CD160, TIGIT, CD96, CRTAM, LAIR1, SIGLEC7, SIGLEC9, CD244, TNFRSF10B, TNFRSF10A, CASP8, CASP10, CASP3, CASP6, CASP7, FADD, FAS, SMAD2, SMAD3, SMAD4, SMAD10, SKI, SKIL, TGIF1, IL10RA, IL10RB, HMOX2, IL6R, IL6ST, EIF2AK4, CSK, PAG1, SIT1, FOXP3, PRDM1, BATF, GUCY1A2, GUCY1A3, GUCY1B2 и GUCY1B3.

[001085] Неограничивающие примеры генов, которые могут быть усилены вследствие постоянного редактирования генов TIL с помощью метода CRISPR, включают CCR2, CCR4, CCR5, CXCR2, CXCR3, CX3CR1, IL-2, IL12, IL-15 и IL-21.

[001086] Примеры систем, способов и композиций для изменения экспрессии последовательности целевого гена с помощью метода CRISPR, которые могут быть использованы в соответствии с вариантами осуществления настоящего изобретения, описаны в патентах США №№ 8697359, 8993233, 8795965, 8771945, 8889356, 8865406, 8999641, 8945839, 8932814, 8871445, 8906616 и 8895308, которые включены в настоящий документ посредством ссылки. Средства для реализации методов CRISPR, такие как плазмиды для экспрессии CRISPR/Cas9 и CRISPR/Cpf1, коммерчески доступны от таких компаний, как GenScript.

[001087] В одном из вариантов осуществления генетические модификации

популяций TIL, как описано в настоящем документе, могут быть проведены с использованием системы CRISPR/Cpf1, как описано в патенте США US 9790490, содержание которого включено в настоящий документ посредством ссылки.

[001088] Способ экспансии TIL в терапевтическую популяцию может быть осуществлен в соответствии с любым из вариантов осуществления способов, описанных в настоящем документе (например, процессом 2A), или как описано в PCT/US2017/058610, PCT/US2018/012605 или PCT/US2018/012633, где способ дополнительно включает редактирование генов по меньшей мере части TIL с помощью метода TALE. Согласно частным вариантам осуществления применение метода TALE во время процесса экспансии TIL вызывает сайленсинг или уменьшение экспрессии одного или более генов иммунных контрольных точек в по меньшей мере части терапевтической популяции TIL. В качестве альтернативы, применение метода TALE во время процесса экспансии TIL вызывает усиление экспрессии одного или более генов иммунных контрольных точек в по меньшей мере части терапевтической популяции TIL.

[001089] TALE расшифровывается как «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 методом TALE. TALE представляют собой встречающиеся в природе белки из рода фитопатогенных бактерий *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 повторяющиеся вариабельные ди-остатки (RVD). Модульные повторы TALE связаны друг с другом для распознавания смежных последовательностей ДНК. Конкретный RVD в ДНК-связывающем домене распознает основание в целевом локусе, что дает структурную особенность для сборки предсказуемых ДНК-связывающих доменов. ДНК-связывающие домены TALE сливают с каталитическим доменом эндонуклеазы FokI типа IIS с получением нацеливаемой нуклеазы TALE. Чтобы вызвать сайт-специфическую мутацию, два отдельных плеча TALEN, разделенные спейсерной областью из 14-20 пар оснований, сближают мономеры FokI для димеризации и создания целевого двухцепочечного разрыва.

[001090] Несколько крупных систематических исследований с использованием различных методов сборки показали, что повторы TALE можно комбинировать для распознавания практически любой произвольно заданной последовательности. Специально разработанные модули TALE также коммерчески доступны от Cellectis Bioresearch (Париж, Франция), Transposagen Biopharmaceuticals (Лексингтон, Кентукки, США) и Life Technologies (Гранд-Айленд, Нью-Йорк, США). Методы TALE и TALEN, подходящие для применения в настоящем изобретении, описаны в публикациях заявок 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 в настоящий документ посредством ссылки.

[001091] Неограничивающие примеры генов, которые могут быть подвергнуты сайленсингу или ингибированы вследствие постоянного редактирования генов TIL с помощью метода TALE, включают PD-1, CTLA-4, LAG-3, HAVCR2 (TIM-3), Cish, TGFβ, PKA, CBL-B, PPP2CA, PPP2CB, PTPN6, PTPN22, PDCD1, BTLA, CD160, TIGIT, CD96, CRTAM, LAIR1, SIGLEC7, SIGLEC9, CD244, TNFRSF10B, TNFRSF10A, CASP8, CASP10, CASP3, CASP6, CASP7, FADD, FAS, SMAD2, SMAD3, SMAD4, SMAD10, SKI, SKIL, TGIF1, IL10RA, IL10RB, HMOX2, IL6R, IL6ST, EIF2AK4, CSK, PAG1, SIT1, FOXP3, PRDM1, BATF, GUCY1A2, GUCY1A3, GUCY1B2 и GUCY1B3.

[001092] Неограничивающие примеры генов, которые могут быть усилены вследствие постоянного редактирования генов TIL с помощью метода TALE, включают CCR2, CCR4, CCR5, CXCR2, CXCR3, CX3CR1, IL-2, IL12, IL-15 и IL-21.

[001093] Примеры систем, способов и композиций для изменения экспрессии последовательности целевого гена с помощью метода TALE, которые могут быть использованы в соответствии с вариантами осуществления настоящего изобретения, описаны в патенте США № 8586526, включенном в настоящий документ посредством ссылки.

[001094] Способ экспансии TIL в терапевтическую популяцию может быть осуществлен в соответствии с любым из вариантов осуществления способов, описанных в настоящем документе (например, процессом GEN 3), или как описано в PCT/US2017/058610, PCT/US2018/012605 или PCT/US2018/012633, где способ дополнительно включает редактирование генов по меньшей мере части TIL с помощью метода цинковых пальцев или нуклеазы с цинковыми пальцами. Согласно частным вариантам осуществления применение метода цинковых пальцев во время процесса экспансии TIL вызывает сайленсинг или уменьшение экспрессии одного или более генов иммунных контрольных точек в по меньшей мере части терапевтической популяции TIL. В качестве альтернативы, применение метода цинковых пальцев во время процесса экспансии TIL вызывает усиление экспрессии одного или более генов иммунных контрольных точек в по меньшей мере части терапевтической популяции TIL.

[001095] Отдельный цинковый палец содержит примерно 30 аминокислот в консервативной конфигурации ββα. Несколько аминокислот на поверхности α-спирали обычно контактируют с 3 п.н. в большой бороздке ДНК с различными уровнями селективности. Цинковые пальцы имеют два белковых домена. Первый домен представляет собой ДНК-связывающий домен, который включает эукариотические факторов транскрипции и содержит цинковый палец. Второй домен представляет собой нуклеазный домен, который включает рестрикционный фермент FokI и отвечает за каталитическое расщепление ДНК.

[001096] 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 цинковых пальцев специфичны к их предполагаемому целевому сайту, то даже пара ZFN с 3 пальцами, которые распознают в общей сложности 18 пар

оснований, теоретически могут нацеливаться на один локус в геноме млекопитающих. Одним из методов создания новых массивов цинковых пальцев является объединение «модулей» цинковых пальцев меньшего размера 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. В качестве альтернативы, подходы на основе отбора, такие как конструирование олигомеризованного пула (OPEN), могут использоваться для выбора новых массивов цинковых пальцев из рандомизированных библиотек, которые учитывают контекстно-зависимые взаимодействия между соседними пальцами. Сконструированные цинковые пальцы коммерчески доступны; Sangamo Biosciences (Ричмонд, Калифорния, США) разработала собственную платформу (CompoZr®) для создания конструкций с цинковыми пальцами в партнерстве с Sigma-Aldrich (Сент-Луис, Миссури, США).

[001097] Неограничивающие примеры генов, которые могут быть подвергнуты сайленсингу или ингибированы вследствие постоянного редактирования генов TIL с помощью метода цинковых пальцев, включают PD-1, CTLA-4, LAG-3, HAVCR2 (TIM-3), Cish, TGFβ, PKA, CBL-B, PPP2CA, PPP2CB, PTPN6, PTPN22, PDCD1, BTLA, CD160, TIGIT, CD96, CRTAM, LAIR1, SIGLEC7, SIGLEC9, CD244, TNFRSF10B, TNFRSF10A, CASP8, CASP10, CASP3, CASP6, CASP7, FADD, FAS, SMAD2, SMAD3, SMAD4, SMAD10, SKI, SKIL, TGIF1, IL10RA, IL10RB, HMOX2, IL6R, IL6ST, EIF2AK4, CSK, PAG1, SIT1, FOXP3, PRDM1, BATF, GUCY1A2, GUCY1A3, GUCY1B2 и GUCY1B3.

[001098] Неограничивающие примеры генов, которые могут быть усилены вследствие постоянного редактирования генов TIL с помощью метода цинковых пальцев, включают CCR2, CCR4, CCR5, CXCR2, CXCR3, CX3CR1, IL-2, IL12, IL-15 и IL-21.

[001099] Примеры систем, способов и композиций для изменения экспрессии последовательности целевого гена с помощью метода цинковых пальцев, которые могут быть использованы в соответствии с вариантами осуществления настоящего изобретения, описаны в патентах США №№ 6534261, 6607882, 6746838, 6794136, 6824978, 6866997, 6933113, 6979539, 7013219, 7030215, 7220719, 7241573, 7241574, 7585849, 7595376, 6903185 и 6479626, которые включены в настоящий документ посредством ссылки.

[001100] Другие примеры систем, способов и композиций для изменения экспрессии последовательности целевого гена с помощью метода цинковых пальцев, которые могут быть использованы в соответствии с вариантами осуществления настоящего изобретения, описаны в источнике Beane, *et al.*, *Mol. Therapy*, 2015, 23 1380-1390, содержание которого включено в настоящий документ посредством ссылки.

[001101] В некоторых вариантах осуществления TIL необязательно генетически модифицируют для включения дополнительных функций, в том числе, не ограничиваясь перечисленным, высокоаффинного Т-клеточного рецептора (TCR), например, TCR, нацеленного на опухолеассоциированный антиген, такой как MAGE-1, HER2 или NY-ESO-1, или химерного антигенного рецептора (CAR), связывающегося с

опухолеассоциированной молекулой клеточной поверхности (например, мезотелином) или линейно-специфической молекулой клеточной поверхности (например, CD19). В отдельных вариантах осуществления способ включает генетическую модификацию популяции TIL для включения высокоаффинного Т-клеточного рецептора (TCR), например, TCR, нацеленного на опухолеассоциированный антиген, такой как MAGE-1, HER2 или NY-ESO-1, или химерного антигенного рецептора (CAR), связывающегося с опухолеассоциированной молекулой клеточной поверхности (например, мезотелином) или линейно-специфической молекулой клеточной поверхности (например, CD19). Соответственно, популяция TIL может представлять собой первую популяцию, вторую популяцию и/или третью популяцию, как описано в настоящем документе.

Закрытые системы для производства TIL

[001102] Настоящее изобретение предусматривает применение закрытых систем в процессе культивирования TIL. Такие закрытые системы позволяют предотвратить и/или уменьшить микробиологическое загрязнение, позволяют использовать меньшее количество колб и позволяют снизить затраты. В некоторых вариантах осуществления в закрытой системе используются два контейнера.

[001103] Такие закрытые системы хорошо известны в данной области техники, и их можно найти, например, по ссылке http://www.fda.gov/cber/guidelines.htm и https://www.fda.gov/BiologicsBloodVaccines/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/Blood/ucm076779.htm.

[001104] Стерильные соединительные устройства (STCD) обеспечивают стерильные соединения между двумя частями системы трубок. Эта процедура обеспечивает стерильное соединение различных контейнеров и трубок разных диаметров. В некоторых вариантах осуществления закрытые системы включают в себя системы с соединением по типу Луер-Лок (Luer Lock) и запаянные системы, как описано, например, в примере G. В некоторых вариантах осуществления доступ к закрытой системе осуществляется через шприцы в стерильных условиях, чтобы не нарушать стерильность и закрытый характер системы. В некоторых вариантах осуществления используют закрытую систему, как описано в примере G. В некоторых вариантах осуществления из TIL получают контейнер с готовым продуктом в соответствии со способом, описанным в примере G, раздел «Приготовление готового препарата и заполнение».

[001105] В некоторых вариантах осуществления в закрытой системе используется один контейнер с момента получения фрагментов опухоли до момента, когда TIL будут готовы для введения пациенту или криоконсервации. В некоторых вариантах осуществления, когда используются два контейнера, первый контейнер представляет собой закрытый G-контейнер, и популяцию TIL центрифугируют и переносят в пакет для инфузии без открытия первого закрытого G-контейнера. В некоторых вариантах осуществления, когда используются два контейнера, пакет для инфузии представляет собой пакет для инфузии, содержащий HypoThermosol. Закрытая система или закрытая система культивирования TIL-клеток характеризуется тем, что после добавления образца опухоли

и/или фрагментов опухоли систему герметично закрывают снаружи для образования закрытой среды, свободной от проникновения бактерий, грибов и/или любого другого микробиологического загрязнения.

[001106] В некоторых вариантах осуществления снижение микробиологического загрязнения составляет от приблизительно 5% до приблизительно 100%. В некоторых вариантах осуществления снижение микробиологического загрязнения составляет от приблизительно 5% до приблизительно 95%. В некоторых вариантах осуществления снижение микробиологического загрязнения составляет от приблизительно 5% до приблизительно 90%. В некоторых вариантах осуществления снижение микробиологического загрязнения составляет от приблизительно 10% до приблизительно 90%. В некоторых вариантах осуществления снижение микробиологического загрязнения составляет от приблизительно 15% до приблизительно 85%. В некоторых вариантах осуществления снижение микробиологического 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%.

[001107] Закрытая система позволяет TIL расти в отсутствие и/или при значительно сниженном микробиологическом загрязнении.

[001108] Более того, все из pH, парциального давления диоксида углерода и парциального давления кислорода среды для культивирования TIL-клеток варьируются по мере культивирования клеток. Следовательно, даже несмотря на то, что среда, подходящая для клеточной культуры, циркулирует, тем не менее, необходимо постоянно поддерживать закрытую среду как оптимальную среду для пролиферации TIL. С этой целью желательно, чтобы физические факторы pH, парциального давления диоксида углерода и парциального давления кислорода в культуральной жидкости в закрытой среде контролировались с помощью датчика, сигнал которого используется для управления газообменником, установленным на входе в культуральную среду, и парциальное давление этого газа в закрытой среде регулировалось в реальном времени в соответствии с изменениями в культуральной жидкости, чтобы оптимизировать среду для культивирования клеток. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предложена закрытая система для культивирования клеток, которая включает на входе в закрытую среду газообменник, оборудованный контролирующим устройством, которое измеряет pH, парциальное давление диоксида углерода и парциальное давление кислорода в закрытой среде и оптимизирует среду, в которой культивируются клетки, автоматически регулируя концентрации газов на основе сигналов от контролирующего устройства.

[001109] В некоторых вариантах осуществления давление в закрытой среде регулируется непрерывно или периодически. То есть, давление в закрытой среде можно

изменять, например, с помощью устройства для поддержания давления, чтобы пространство подходило для роста TIL в состоянии положительного давления, или для способствования экссудации жидкости в состоянии отрицательного давления и тем самым способствования пролиферации клеток. Кроме того, периодически применяя отрицательное давление, можно равномерно и эффективно заменять циркулирующую жидкость в закрытой среде за счет временного сокращения объема закрытой среды.

[001110] В некоторых вариантах осуществления оптимальные компоненты культуры для пролиферации TIL могут быть заменены или добавлены, и могут быть добавлены такие факторы, как IL-2 и/или OKT3, а также их комбинация.

Необязательная криоконсервация TIL

[001111] Либо общая популяция TIL (например, вторая популяция TIL), либо подвергнутая экспансии популяция TIL (например, третья популяция TIL) может быть необязательно криоконсервирована. В некоторых вариантах осуществления криоконсервацию осуществляют в отношении терапевтической популяции TIL. В некоторых вариантах осуществления криоконсервацию осуществляют в отношении TIL, собранных после второй экспансии. В некоторых вариантах осуществления криоконсервацию осуществляют в отношении TIL на иллюстративном этапе F на фиг. 1 (в частности, например, фиг. 1B и/или фиг. 1C). В некоторых вариантах осуществления TIL криоконсервируют в пакете для инфузии. В некоторых вариантах осуществления TIL криоконсервируют перед помещением в пакет для инфузии. В некоторых вариантах осуществления TIL криоконсервируют и не помещают в пакет для инфузии. В некоторых вариантах осуществления криоконсервацию проводят с использованием среды для криоконсервации. В некоторых вариантах осуществления среда для криоконсервации содержит диметилсульфоксид (ДМСО). Обычно ее осуществляют путем помещения популяции TIL в замораживающий раствор, например, 85% сыворотки группы AB с инактивированным комплементом и 15% диметилсульфоксида (ДМСО). Клетки в растворе помещают в криогенные флаконы и хранят в течение 24 часов при -80°C с необязательным переносом в морозильные камеры, охлаждаемые газообразным азотом, для криоконсервации. См. Sadeghi, *et al., Acta Oncologica* **2013,** *52,* 978-986.

[001112] При необходимости клетки удаляют из морозильной камеры и размораживают на водяной бане при 37°C до тех пор, пока не разморозится примерно 4/5 раствора. Клетки обычно повторно суспендируют в полной среде и необязательно промывают один или более раз. В некоторых вариантах осуществления размороженные TIL могут быть подсчитаны и оценены на жизнеспособность, как это известно в данной области техники.

[001113] В предпочтительном варианте осуществления популяцию TIL криоконсервируют с использованием среды для криоконсервации CS10 (CryoStor 10, BioLife Solutions). В предпочтительном варианте осуществления популяцию TIL криоконсервируют с использованием среды для криоконсервации, содержащей диметилсульфоксид (ДМСО). В предпочтительном варианте осуществления популяцию

TIL криоконсервируют с использованием CS10 и среды для культивирования клеток в соотношении 1:1 (об.:об.). В предпочтительном варианте осуществления популяцию TIL криоконсервируют с использованием CS10 и среды для культивирования клеток в соотношении 1:1 (об.:об.), дополнительно содержащих добавку IL-2.

[001114] Как обсуждалось выше и проиллюстрировано на этапах от A до E, представленных на фиг. 1 (в частности, например, фиг. 1B и/или фиг. 1C), криоконсервация может происходить в ряде моментов на протяжении процесса экспансии TIL. В некоторых вариантах осуществления подвергнутая экспансии популяция TIL после второй экспансии (как предусмотрено, например, в соответствии с этапом D на фиг. 1 (в частности, например, фиг. 1B и/или фиг. 1C)) может быть криоконсервирована. Криоконсервацию обычно проводят путем помещения популяции TIL в замораживающий раствор, например, 85% сыворотки группы AB с инактивированным комплементом и 15% диметилсульфоксида (ДМСО). Клетки в растворе помещают в криогенные флаконы и хранят в течение 24 часов при -80°C с необязательным переносом в морозильные камеры, охлаждаемые газообразным азотом, для криоконсервации. См. Sadeghi, *et al., Acta Oncologica* **2013,** *52,* 978-986. В некоторых вариантах осуществления изобретения TIL криоконсервируют в 5% ДМСО. В некоторых вариантах осуществления TIL криоконсервируют в среде для культивирования клеток плюс 5% ДМСО. В некоторых вариантах осуществления TIL криоконсервируют в соответствии со способами, приведенными в примере D.

[001115] При необходимости клетки удаляют из морозильной камеры и размораживают на водяной бане при 37°C до тех пор, пока не разморозится примерно 4/5 раствора. Клетки обычно повторно суспендируют в полной среде и необязательно промывают один или более раз. В некоторых вариантах осуществления размороженные TIL могут быть подсчитаны и оценены на жизнеспособность, как это известно в данной области техники.

[001116] В некоторых случаях популяция TIL из этапа B может быть сразу же криоконсервирована с использованием протоколов, обсуждаемых ниже. В качестве альтернативы, общая популяция TIL может быть подвергнута этапу C и этапу D, а затем криоконсервирована после этапа D. Аналогичным образом, в случае, когда генетически модифицированные TIL будут применяться в терапии, популяции TIL из этапа B или этапа D могут быть подвергнуты генетическим модификациям для подходящей обработки.

Фенотипические характеристики подвергнутых экспансии TIL

[001117] В некоторых вариантах осуществления TIL после экспансии анализируют на предмет экспрессии целого ряда фенотипических маркеров, включая описанные в настоящем документе и в разделе примеров. В одном из вариантов осуществления проверяют экспрессию одного или более фенотипических маркеров. В некоторых вариантах осуществления фенотипические характеристики TIL анализируют после первой экспансии на этапе B. В некоторых вариантах осуществления фенотипические характеристики TIL анализируют во время перехода на этапе C. В некоторых вариантах осуществления фенотипические характеристики TIL анализируют во время перехода в

соответствии с этапом C и после криоконсервации. В некоторых вариантах осуществления фенотипические характеристики TIL анализируют после второй экспансии в соответствии с этапом D. В некоторых вариантах осуществления фенотипические характеристики TIL анализируют после двух или более экспансий в соответствии с этапом D.

[001118] В некоторых вариантах осуществления маркер выбран из группы, состоящей из CD8 и CD28. В некоторых вариантах осуществления проверяют экспрессию CD8. В некоторых вариантах осуществления проверяют экспрессию CD28. В некоторых вариантах осуществления экспрессия CD8 и/или CD28 выше на TIL, полученных в соответствии с процессом согласно настоящему изобретению, по сравнению с другими процессами (например, процесс Gen 3, как показано, например, на фиг. 1 (в частности, например, фиг. 1B), по сравнению с процессом 2A, как показано, например, на фиг. 1 (в частности, например, фиг. 1B)). В некоторых вариантах осуществления экспрессия CD8 выше на TIL, полученных в соответствии с процессом согласно настоящему изобретению, по сравнению с другими процессами (например, процесс Gen 3, как показано, например, на фиг. 1 (в частности, например, фиг. 1B и/или фиг. 1C), по сравнению с процессом 2A, как показано, например, на фиг. 1 (в частности, например, фиг. 1B и/или фиг. 1C)). В некоторых вариантах осуществления экспрессия CD28 выше на TIL, полученных в соответствии с процессом согласно настоящему изобретению, по сравнению с другими процессами (например, процесс Gen 3, как показано, например, на фиг. 1 (в частности, например, фиг. 1B и/или фиг. 1C), по сравнению с процессом 2A, как показано, например, на фиг. 1 (в частности, например, фиг. 1A)). В некоторых вариантах осуществления высокая экспрессия CD28 свидетельствует о более молодом, более устойчивом фенотипе TIL. В одном из вариантов осуществления измеряют экспрессию одного или более регуляторных маркеров.

[001119] В одном из вариантов осуществления отбор первой популяции TIL, второй популяции TIL, третьей популяции TIL или собранной популяции TIL на основе экспрессии CD8 и/или CD28 не проводится ни на одном из этапов способа экспансии опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов (TIL), описанного в настоящем документе.

[001120] В некоторых вариантах осуществления процент клеток центральной памяти выше на TIL, полученных в соответствии с процессом согласно настоящему изобретению, по сравнению с другими процессами (например, процесс Gen 3, как показано, например, на фиг. 1 (в частности, например, фиг. 1B), по сравнению с процессом 2A, как показано, например, на фиг. 1 (в частности, например, фиг. 1A)). В некоторых вариантах осуществления маркер памяти для клеток центральной памяти выбран из группы, состоящей из CCR7 и CD62L.

[001121] В некоторых вариантах осуществления субпопуляции памяти CD4+ и/или CD8+ TIL могут быть разделены на разные субпопуляции памяти. В некоторых вариантах осуществления CD4+ и/или CD8+ TIL включают наивные (CD45RA+CD62L+) TIL. В некоторых вариантах осуществления CD4+ и/или CD8+ TIL включают TIL центральной памяти (CM; CD45RA-CD62L+). В некоторых вариантах осуществления CD4+ и/или CD8+ TIL включают TIL эффекторной памяти (EM; CD45RA-CD62L-). В некоторых вариантах

осуществления CD4+ и/или CD8+ TIL включают RA+ эффекторные TIL/эффекторной памяти (TEMRA/TEFF; CD45RA+CD62L+).

[001122] В некоторых вариантах осуществления TIL экспрессируют еще один маркер, выбранный из группы, состоящей из гранзима B, перфорина и гранулизина. В некоторых вариантах осуществления TIL экспрессируют гранзим B. В некоторых вариантах осуществления TIL экспрессируют перфорин. В некоторых вариантах осуществления TIL экспрессируют гранулизин.

[001123] В одном из вариантов осуществления рестимулированные TIL также могут быть оценены на предмет высвобождения цитокинов с использованием анализов высвобождения цитокинов. В некоторых вариантах осуществления TIL могут быть оценены на предмет секреции интерферона-γ (IFN-γ). В некоторых вариантах осуществления секрецию IFN-γ измеряют с помощью анализа ELISA. В некоторых вариантах осуществления секрецию IFN-γ измеряют с помощью анализа ELISA после этапа быстрой второй экспансии, после этапа D, как показано, например, на фиг. 1 (в частности, например, фиг. 1B и/или фиг. 1C). В некоторых вариантах осуществления здоровье TIL измеряют по секреции IFN-гамма (IFN-γ). В некоторых вариантах осуществления секреция IFN-γ свидетельствует о наличии активных TIL. В некоторых вариантах осуществления используют определение содержания действующего вещества по продукции IFN-γ. Продукция IFN-γ является еще одним показателем цитотоксического потенциала. Продукция IFN-γ может быть измерена путем определения уровней цитокина IFN-γ в среде TIL, стимулированной антителами к CD3, CD28 и CD137/4-1BB. Уровни IFN-γ в среде из этих стимулированных TIL могут быть определены с помощью измерения высвобождения IFN-γ. В некоторых вариантах осуществления увеличение продукции IFN-γ, например, TIL из этапа D процесса Gen 3, как показано, например, на фиг. 1 (в частности, например, фиг. 1B и/или фиг. 1C), по сравнению с, например, этапом D процесса 2A, как показано, например, на фиг. 1 (в частности, например, фиг. 1A), свидетельствует об увеличении цитотоксического потенциала TIL, полученных на этапе D. В некоторых вариантах осуществления секреция IFN-γ увеличена в один, два, три, четыре или пять, или более раз. В некоторых вариантах осуществления секреция IFN-γ увеличена в один раз. В некоторых вариантах осуществления секреция IFN-γ увеличена в два раза. В некоторых вариантах осуществления секреция IFN-γ увеличена в три раза. В некоторых вариантах осуществления секреция IFN-γ увеличена в четыре раза. В некоторых вариантах осуществления секреция IFN-γ увеличена в пять раз. В некоторых вариантах осуществления IFN-γ измеряют с использованием набора для ELISA от Quantikine. В некоторых вариантах осуществления IFN-γ измеряют в TIL *ex vivo*. В некоторых вариантах осуществления IFN-γ измеряют в TIL *ex vivo*, включая TIL, полученные способами согласно настоящему изобретению, включая, например, способы, показанные на фиг. 1B и/или фиг. 1C.

[001124] В некоторых вариантах осуществления TIL, способные к по меньшей мере в один, два, три, четыре или пять, или более раз более высокой секреции IFN-γ, представляют собой TIL, получаемые способами экспансии согласно настоящему

изобретению, включая, например, способы, показанные на фиг. 1B и/или фиг. 1C. В некоторых вариантах осуществления TIL, способные к по меньшей мере в один раз более высокой секреции IFN-γ, представляют собой TIL, получаемые способами экспансии согласно настоящему изобретению, включая, например, способы, показанные на фиг. 1B и/или фиг. 1C. В некоторых вариантах осуществления TIL, способные к по меньшей мере в два раза более высокой секреции IFN-γ, представляют собой TIL, получаемые способами экспансии согласно настоящему изобретению, включая, например, способы, показанные на фиг. 1B и/или фиг. 1C. В некоторых вариантах осуществления TIL, способные к по меньшей мере в три раза более высокой секреции IFN-γ, представляют собой TIL, получаемые способами экспансии согласно настоящему изобретению, включая, например, способы, показанные на фиг. 1B и/или фиг. 1C. В некоторых вариантах осуществления TIL, способные к по меньшей мере в четыре раза более высокой секреции IFN-γ, представляют собой TIL, получаемые способами экспансии согласно настоящему изобретению, включая, например, способы, показанные на фиг. 1B и/или фиг. 1C. В некоторых вариантах осуществления TIL, способные к по меньшей мере в пять раз более высокой секреции IFN-γ, представляют собой TIL, получаемые способами экспансии согласно настоящему изобретению, включая, например, способы, показанные на фиг. 1B и/или фиг. 1C.

[001125] Различные антигенные рецепторы Т- и В-лимфоцитов продуцируются соматической рекомбинацией ограниченного, но большого числа генных сегментов. Эти генные сегменты: V (от англ. variable - вариабельный), D (от англ. diversity - разнообразие), J (от англ. joining - соединяющий) и C (от англ. constant - константный) определяют специфичность связывания и последующие сферы применения иммуноглобулинов и Т-клеточных рецепторов (TCR). Настоящее изобретение обеспечивает способ создания TIL, которые демонстрируют и увеличивают разнообразие репертуара Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления TIL, полученные настоящим способом, демонстрируют увеличение разнообразия репертуара Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления TIL, полученные настоящим способом, демонстрируют увеличение разнообразия репертуара Т-клеток по сравнению со свежесобранными TIL и/или TIL, полученными с использованием других способов, отличных от предложенных в настоящем документе, включая, например, способы, отличные от тех, которые воплощены на фиг. 1 (в частности, например, фиг. 1B и/или фиг. 1C). В некоторых вариантах осуществления TIL, полученные настоящим способом, демонстрируют увеличение разнообразия репертуара Т-клеток по сравнению со свежесобранными TIL и/или TIL, полученными с использованием способов, называемых процессом 2A, как проиллюстрировано на фиг. 1 (в частности, например, фиг. 1A). В некоторых вариантах осуществления TIL, полученные при первой экспансии, демонстрируют увеличение разнообразия репертуара Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления увеличение разнообразия представляет собой увеличение разнообразия иммуноглобулинов и/или разнообразия Т-клеточных рецепторов. В некоторых вариантах осуществления разнообразие имеет место в иммуноглобулинах, а именно, в тяжелой цепи иммуноглобулина. В некоторых вариантах осуществления разнообразие имеет место в

иммуноглобулинах, а именно, в легкой цепи иммуноглобулина. В некоторых вариантах осуществления разнообразие имеет место в Т-клеточных рецепторах. В некоторых вариантах осуществления разнообразие имеет место в одном из Т-клеточных рецепторов, выбранных из группы, состоящей из рецепторов альфа, бета, гамма и дельта. В некоторых вариантах осуществления наблюдается увеличение экспрессии Т-клеточного рецептора (TCR) альфа и/или бета. В некоторых вариантах осуществления наблюдается увеличение экспрессии Т-клеточного рецептора (TCR) альфа. В некоторых вариантах осуществления наблюдается увеличение экспрессии Т-клеточного рецептора (TCR) бета. В некоторых вариантах осуществления наблюдается увеличение экспрессии TCRab (т. е. TCRα/β). В некоторых вариантах осуществления процесс, описанный в настоящем документе (например, процесс Gen 3), демонстрирует более высокое клональное разнообразие по сравнению с другими процессами, например, процессом, называемым Gen 2, на основе количества уникальных пептидных CDR в образце (см., например, фиг. 12-14).

[001126] В некоторых вариантах осуществления TIL, полученные способами согласно настоящему изобретению, включая описанные, например, на фиг. 1, демонстрируют повышенную поликлональность по сравнению с TIL, полученными другими способами, включая способы, не проиллюстрированные на фиг. 1, такие как, например, способы, называемые способами процесса 1C. В некоторых вариантах осуществления значительно улучшенная поликлональность и/или повышенная поликлональность свидетельствует об эффективности лечения и/или повышенной клинической эффективности для лечения рака. В некоторых вариантах осуществления поликлональность относится к разнообразию репертуара Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления повышение поликлональности может свидетельствовать об эффективности лечения в отношении введения TIL, полученных способами согласно настоящему изобретению. В некоторых вариантах осуществления поликлональность повышена в один, два, десять, 100, 500 или 1000 раз по сравнению с TIL, полученными с использованием способов, отличных от предложенных в настоящем документе, включая, например, способы, отличные от воплощенных на фиг. 1. В некоторых вариантах осуществления поликлональность повышена в один раз по сравнению с пациентом, не получавшим лечения, и/или по сравнению с пациентом, получавшим TIL, полученные с использованием способов, отличных от предложенных в настоящем документе, включая, например, способы, отличные от воплощенных на фиг. 1. В некоторых вариантах осуществления поликлональность повышена в два раза по сравнению с пациентом, не получавшим лечения, и/или по сравнению с пациентом, получавшим TIL, полученные с использованием способов, отличных от предложенных в настоящем документе, включая, например, способы, отличные от воплощенных на фиг. 1. В некоторых вариантах осуществления поликлональность повышена в десять раз по сравнению с пациентом, не получавшим лечения, и/или по сравнению с пациентом, получавшим TIL, полученные с использованием способов, отличных от предложенных в настоящем документе, включая, например, способы, отличные от воплощенных на фиг. 1. В некоторых вариантах осуществления

поликлональность повышена в 100 раз по сравнению с пациентом, не получавшим лечения, и/или по сравнению с пациентом, получавшим TIL, полученные с использованием способов, отличных от предложенных в настоящем документе, включая, например, способы, отличные от воплощенных на фиг. 1. В некоторых вариантах осуществления поликлональность повышена в 500 раз по сравнению с пациентом, не получавшим лечения, и/или по сравнению с пациентом, получавшим TIL, полученные с использованием способов, отличных от предложенных в настоящем документе, включая, например, способы, отличные от воплощенных на фиг. 1. В некоторых вариантах осуществления поликлональность повышена в 1000 раз по сравнению с пациентом, не получавшим лечения, и/или по сравнению с пациентом, получавшим TIL, полученные с использованием способов, отличных от предложенных в настоящем документе, включая, например, способы, отличные от воплощенных на фиг. 1.

[001127] В некоторых вариантах осуществления активация и истощение TIL могут быть определены путем проверки одного или более маркеров. В некоторых вариантах осуществления активация и истощение могут быть определены с помощью многоцветной проточной цитометрии. В некоторых вариантах осуществления маркеры активации и истощения включают, не ограничиваясь перечисленным, 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. В некоторых вариантах осуществления маркеры активации и истощения включают, не ограничиваясь перечисленным, один или более маркеров, выбранных из группы, состоящей из BTLA, CTLA-4, ICOS, Ki67, LAG-3, PD-1, TIGIT и/или TIM-3. В некоторых вариантах осуществления маркеры активации и истощения включают, не ограничиваясь перечисленным, 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. В некоторых вариантах осуществления маркеры Т-клеток (включая маркеры активации и истощения) могут быть определены и/или проанализированы для изучения активации, ингибирования или функции Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления маркеры Т-клеток могут включать, не ограничиваясь перечисленным, 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.

[001128] В некоторых вариантах осуществления фенотипические характеристики определяют после криоконсервации.

Дополнительные варианты осуществления процесса

[001129] В некоторых вариантах осуществления изобретения предложен способ экспансии опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов (TIL) в терапевтическую популяцию TIL, включающий: (a) получение первой популяции TIL из опухоли, резецированной у субъекта, путем обработки образца опухоли, полученного от указанного субъекта, с получением множества фрагментов опухоли; (b) проведение примирующей первой экспансии путем культивирования первой популяции TIL в среде для культивирования

клеток, содержащей IL-2 и OKT-3, где примирующую первую экспансию проводят в течение приблизительно 1-8 дней, с получением второй популяции TIL, где вторая популяция TIL больше по численности, чем первая популяция TIL; (c) проведение быстрой второй экспансии путем приведения второй популяции TIL в контакт со средой для культивирования клеток, содержащей IL-2, OKT-3 и экзогенные антигенпрезентирующие клетки (АПК), с получением третьей популяции TIL, где быструю вторую экспансию проводят в течение приблизительно 1-10 дней, с получением третьей популяции TIL, где третья популяция TIL представляет собой терапевтическую популяцию TIL; и (d) сбор терапевтической популяции TIL, полученной на этапе (c). В некоторых вариантах осуществления этап быстрой второй экспансии разделен на множество этапов для достижения вертикального масштабирования культивирования посредством: (1) проведения быстрой второй экспансии путем культивирования второй популяции TIL в мелкомасштабной культуре в первом контейнере, например, контейнере G-REX 100MCS, в течение приблизительно от 2 до 4 дней, а затем (2) осуществления переноса второй популяции TIL из мелкомасштабной культуры во второй контейнер, большего размера, чем первый контейнер, например, контейнер G-REX 500MCS, где во втором контейнере вторую популяцию TIL из мелкомасштабной культуры культивируют в более крупномасштабной культуре в течение приблизительно от 4 до 8 дней. В некоторых вариантах осуществления этап быстрой экспансии разделен на множество этапов для достижения горизонтального масштабирования культивирования посредством: (1) проведения быстрой второй экспансии путем культивирования второй популяции TIL в первой мелкомасштабной культуре в первом контейнере, например, контейнере G-REX 100MCS, в течение приблизительно от 3 до 4 дней, а затем (2) осуществления переноса и распределения второй популяции TIL из первой мелкомасштабной культуры в и среди по меньшей мере 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 вторых контейнеров, которые равны по размеру первому контейнеру, где в каждом из вторых контейнеров часть второй популяции TIL из первой мелкомасштабной культуры, перенесенную в такой второй контейнер, культивируют во второй мелкомасштабной культуре в течение приблизительно от 4 до 8 дней. В некоторых вариантах осуществления этап быстрой экспансии разделен на множество этапов для достижения горизонтального и вертикального масштабирования культивирования посредством: (1) проведения быстрой второй экспансии путем культивирования второй популяции TIL в мелкомасштабной культуре в первом контейнере, например, контейнере G-REX 100MCS, в течение приблизительно от 2 до 4 дней, а затем (2) осуществления переноса и распределения второй популяции TIL из первой мелкомасштабной культуры в и среди по меньшей мере 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, контейнеров G-REX 500MCS, где в каждом из вторых контейнеров часть второй популяции TIL, перенесенную из мелкомасштабной культуры в такой второй контейнер, культивируют в более крупномасштабной культуре в течение приблизительно от 4 до 8 дней. В некоторых вариантах осуществления этап быстрой экспансии разделен на

множество этапов для достижения горизонтального и вертикального масштабирования культивирования посредством: (1) проведения быстрой второй экспансии путем культивирования второй популяции TIL в мелкомасштабной культуре в первом контейнере, например, контейнере G-REX 100MCS, в течение приблизительно от 3 до 4 дней, а затем (2) осуществления переноса и распределения второй популяции TIL из первой мелкомасштабной культуры в и среди 2, 3 или 4 вторых контейнеров, большего размера, чем первый контейнер, например, контейнеров G-REX 500MCS, где в каждом из вторых контейнеров часть второй популяции TIL, перенесенную из мелкомасштабной культуры в такой второй контейнер, культивируют в более крупномасштабной культуре в течение приблизительно от 5 до 7 дней.

[001130] В некоторых вариантах осуществления изобретения предложен способ экспансии опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов (TIL) в терапевтическую популяцию TIL, включающий: (a) получение первой популяции TIL из опухоли, резецированной у субъекта, путем обработки образца опухоли, полученного от указанного субъекта, с получением множества фрагментов опухоли; (b) проведение примирующей первой экспансии путем культивирования первой популяции TIL в среде для культивирования клеток, содержащей IL-2 и OKT-3, где примирующую первую экспансию проводят в течение приблизительно 1-8 дней, с получением второй популяции TIL, где вторая популяция TIL больше по численности, чем первая популяция TIL; (c) проведение быстрой второй экспансии путем приведения второй популяции TIL в контакт со средой для культивирования клеток, содержащей IL-2, OKT-3 и экзогенные антигенпрезентирующие клетки (АПК), с получением третьей популяции TIL, где быструю вторую экспансию проводят в течение приблизительно 1-8 дней, с получением третьей популяции TIL, где третья популяция TIL представляет собой терапевтическую популяцию TIL; и (d) сбор терапевтической популяции TIL, полученной на этапе (c). В некоторых вариантах осуществления этап быстрой второй экспансии разделен на множество этапов для достижения вертикального масштабирования культивирования посредством: (1) проведения быстрой второй экспансии путем культивирования второй популяции TIL в мелкомасштабной культуре в первом контейнере, например, контейнере G-REX 100MCS, в течение приблизительно от 2 до 4 дней, а затем (2) осуществления переноса второй популяции TIL из мелкомасштабной культуры во второй контейнер, большего размера, чем первый контейнер, например, контейнер G-REX 500MCS, где во втором контейнере вторую популяцию TIL из мелкомасштабной культуры культивируют в более крупномасштабной культуре в течение приблизительно от 4 до 8 дней. В некоторых вариантах осуществления этап быстрой экспансии разделен на множество этапов для достижения горизонтального масштабирования культивирования посредством: (1) проведения быстрой второй экспансии путем культивирования второй популяции TIL в первой мелкомасштабной культуре в первом контейнере, например, контейнере G-REX 100MCS, в течение приблизительно от 2 до 4 дней, а затем (2) осуществления переноса и распределения второй популяции TIL из первой мелкомасштабной культуры в и среди по меньшей мере 2, 3, 4, 5,

6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 вторых контейнеров, которые равны по размеру первому контейнеру, где в каждом из вторых контейнеров часть второй популяции TIL из первой мелкомасштабной культуры, перенесенную в такой второй контейнер, культивируют во второй мелкомасштабной культуре в течение приблизительно от 4 до 6 дней. В некоторых вариантах осуществления этап быстрой экспансии разделен на множество этапов для достижения горизонтального и вертикального масштабирования культивирования посредством: (1) проведения быстрой второй экспансии путем культивирования второй популяции TIL в мелкомасштабной культуре в первом контейнере, например, контейнере G-REX 100MCS, в течение приблизительно от 2 до 4 дней, а затем (2) осуществления переноса и распределения второй популяции TIL из первой мелкомасштабной культуры в и среди по меньшей мере 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, контейнеров G-REX 500MCS, где в каждом из вторых контейнеров часть второй популяции TIL, перенесенную из мелкомасштабной культуры в такой второй контейнер, культивируют в более крупномасштабной культуре в течение приблизительно от 4 до 6 дней. В некоторых вариантах осуществления этап быстрой экспансии разделен на множество этапов для достижения горизонтального и вертикального масштабирования культивирования посредством: (1) проведения быстрой второй экспансии путем культивирования второй популяции TIL в мелкомасштабной культуре в первом контейнере, например, контейнере G-REX 100MCS, в течение приблизительно от 3 до 4 дней, а затем (2) осуществления переноса и распределения второй популяции TIL из первой мелкомасштабной культуры в и среди 2, 3 или 4 вторых контейнеров, большего размера, чем первый контейнер, например, контейнеров G-REX 500MCS, где в каждом из вторых контейнеров часть второй популяции TIL, перенесенную из мелкомасштабной культуры в такой второй контейнер, культивируют в более крупномасштабной культуре в течение приблизительно от 4 до 5 дней.

[001131] В некоторых вариантах осуществления изобретения предложен способ экспансии опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов (TIL) в терапевтическую популяцию TIL, включающий: (a) получение первой популяции TIL из опухоли, резецированной у субъекта, путем обработки образца опухоли, полученного от указанного субъекта, с получением множества фрагментов опухоли; (b) проведение примирующей первой экспансии путем культивирования первой популяции TIL в среде для культивирования клеток, содержащей IL-2 и OKT-3, где примирующую первую экспансию проводят в течение приблизительно 1-7 дней, с получением второй популяции TIL, где вторая популяция TIL больше по численности, чем первая популяция TIL; (c) проведение быстрой второй экспансии путем приведения второй популяции TIL в контакт со средой для культивирования клеток, содержащей IL-2, OKT-3 и экзогенные антигенпрезентирующие клетки (АПК), с получением третьей популяции TIL, где быструю вторую экспансию проводят в течение приблизительно 1-11 дней, с получением третьей популяции TIL, где третья популяция TIL представляет собой терапевтическую популяцию TIL; и (d) сбор

терапевтической популяции TIL, полученной на этапе (c).В некоторых вариантах осуществления этап быстрой второй экспансии разделен на множество этапов для достижения вертикального масштабирования культивирования посредством: (1) проведения быстрой второй экспансии путем культивирования второй популяции TIL в мелкомасштабной культуре в первом контейнере, например, контейнере G-REX 100MCS, в течение приблизительно от 3 до 4 дней, а затем (2) осуществления переноса второй популяции TIL из мелкомасштабной культуры во второй контейнер, большего размера, чем первый контейнер, например, контейнер G-REX 500MCS, где во втором контейнере вторую популяцию TIL из мелкомасштабной культуры культивируют в более крупномасштабной культуре в течение приблизительно от 4 до 7 дней. В некоторых вариантах осуществления этап быстрой экспансии разделен на множество этапов для достижения горизонтального масштабирования культивирования посредством: (1) проведения быстрой второй экспансии путем культивирования второй популяции TIL в первой мелкомасштабной культуре в первом контейнере, например, контейнере G-REX 100MCS, в течение приблизительно от 3 до 4 дней, а затем (2) осуществления переноса и распределения второй популяции TIL из первой мелкомасштабной культуры в и среди по меньшей мере 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 вторых контейнеров, которые равны по размеру первому контейнеру, где в каждом из вторых контейнеров часть второй популяции TIL из первой мелкомасштабной культуры, перенесенную в такой второй контейнер, культивируют во второй мелкомасштабной культуре в течение приблизительно от 4 до 7 дней. В некоторых вариантах осуществления этап быстрой экспансии разделен на множество этапов для достижения горизонтального и вертикального масштабирования культивирования посредством: (1) проведения быстрой второй экспансии путем культивирования второй популяции TIL в мелкомасштабной культуре в первом контейнере, например, контейнере G-REX 100MCS, в течение приблизительно от 3 до 4 дней, а затем (2) осуществления переноса и распределения второй популяции TIL из первой мелкомасштабной культуры в и среди по меньшей мере 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, контейнеров G-REX 500MCS, где в каждом из вторых контейнеров часть второй популяции TIL, перенесенную из мелкомасштабной культуры в такой второй контейнер, культивируют в более крупномасштабной культуре в течение приблизительно от 4 до 7 дней. В некоторых вариантах осуществления этап быстрой экспансии разделен на множество этапов для достижения горизонтального и вертикального масштабирования культивирования посредством: (1) проведения быстрой второй экспансии путем культивирования второй популяции TIL в мелкомасштабной культуре в первом контейнере, например, контейнере G-REX 100MCS, в течение приблизительно 4 дней, а затем (2) осуществления переноса и распределения второй популяции TIL из первой мелкомасштабной культуры в и среди 2, 3 или 4 вторых контейнеров, большего размера, чем первый контейнер, например, контейнеров G-REX 500MCS, где в каждом из вторых контейнеров часть второй популяции TIL, перенесенную из мелкомасштабной культуры в

такой второй контейнер, культивируют в более крупномасштабной культуре в течение приблизительно 5 дней.

[001132] В еще одном варианте осуществления изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих абзацев, как применимо выше, модифицированный таким образом, что на этапе (b) примирующую первую экспансию проводят путем приведения первой популяции TIL в контакт с культуральной средой, которая дополнительно содержит экзогенные антигенпрезентирующие клетки (АПК), где количество АПК в культуральной среде на этапе (c) больше, чем количество АПК в культуральной среде на этапе (b).

[001133] В еще одном варианте осуществления изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих абзацев, как применимо выше, модифицированный таким образом, что на этапе (c) в культуральную среду добавлены дополнительные экзогенные АПК.

[001134] В еще одном варианте осуществления изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих абзацев, как применимо выше, модифицированный таким образом, что соотношение количества АПК, добавляемых при быстрой второй экспансии, к количеству АПК, добавляемых на этапе (b), выбрано из диапазона от или приблизительно от 1,1:1 до или приблизительно до 20:1.

[001135] В еще одном варианте осуществления изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих абзацев, как применимо выше, модифицированный таким образом, что соотношение количества АПК, добавляемых при быстрой второй экспансии, к количеству АПК, добавляемых на этапе (b), выбрано из диапазона от или приблизительно от 1,1:1 до или приблизительно до 10:1.

[001136] В еще одном варианте осуществления изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих абзацев, как применимо выше, модифицированный таким образом, что соотношение количества АПК, добавляемых при быстрой второй экспансии, к количеству АПК, добавляемых на этапе (b), выбрано из диапазона от или приблизительно от 1,1:1 до или приблизительно до 9:1.

[001137] В еще одном варианте осуществления изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих абзацев, как применимо выше, модифицированный таким образом, что соотношение количества АПК, добавляемых при быстрой второй экспансии, к количеству АПК, добавляемых на этапе (b), выбрано из диапазона от или приблизительно от 1,1:1 до или приблизительно до 8:1.

[001138] В еще одном варианте осуществления изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих абзацев, как применимо выше, модифицированный таким образом, что соотношение количества АПК, добавляемых при быстрой второй экспансии, к количеству АПК, добавляемых на этапе (b), выбрано из диапазона от или приблизительно от 1,1:1 до или приблизительно до 7:1.

[001139] В еще одном варианте осуществления изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих абзацев, как применимо выше, модифицированный

таким образом, что соотношение количества АПК, добавляемых при быстрой второй экспансии, к количеству АПК, добавляемых на этапе (b), выбрано из диапазона от или приблизительно от 1,1:1 до или приблизительно до 6:1.

[001140] В еще одном варианте осуществления изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих абзацев, как применимо выше, модифицированный таким образом, что соотношение количества АПК, добавляемых при быстрой второй экспансии, к количеству АПК, добавляемых на этапе (b), выбрано из диапазона от или приблизительно от 1,1:1 до или приблизительно до 5:1.

[001141] В еще одном варианте осуществления изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих абзацев, как применимо выше, модифицированный таким образом, что соотношение количества АПК, добавляемых при быстрой второй экспансии, к количеству АПК, добавляемых на этапе (b), выбрано из диапазона от или приблизительно от 1,1:1 до или приблизительно до 4:1.

[001142] В еще одном варианте осуществления изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих абзацев, как применимо выше, модифицированный таким образом, что соотношение количества АПК, добавляемых при быстрой второй экспансии, к количеству АПК, добавляемых на этапе (b), выбрано из диапазона от или приблизительно от 1,1:1 до или приблизительно до 3:1.

[001143] В еще одном варианте осуществления изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих абзацев, как применимо выше, модифицированный таким образом, что соотношение количества АПК, добавляемых при быстрой второй экспансии, к количеству АПК, добавляемых на этапе (b), выбрано из диапазона от или приблизительно от 1,1:1 до или приблизительно до 2,9:1.

[001144] В еще одном варианте осуществления изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих абзацев, как применимо выше, модифицированный таким образом, что соотношение количества АПК, добавляемых при быстрой второй экспансии, к количеству АПК, добавляемых на этапе (b), выбрано из диапазона от или приблизительно от 1,1:1 до или приблизительно до 2,8:1.

[001145] В еще одном варианте осуществления изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих абзацев, как применимо выше, модифицированный таким образом, что соотношение количества АПК, добавляемых при быстрой второй экспансии, к количеству АПК, добавляемых на этапе (b), выбрано из диапазона от или приблизительно от 1,1:1 до или приблизительно до 2,7:1.

[001146] В еще одном варианте осуществления изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих абзацев, как применимо выше, модифицированный таким образом, что соотношение количества АПК, добавляемых при быстрой второй экспансии, к количеству АПК, добавляемых на этапе (b), выбрано из диапазона от или приблизительно от 1,1:1 до или приблизительно до 2,6:1.

[001147] В еще одном варианте осуществления изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих абзацев, как применимо выше, модифицированный

таким образом, что соотношение количества АПК, добавляемых при быстрой второй экспансии, к количеству АПК, добавляемых на этапе (b), выбрано из диапазона от или приблизительно от 1,1:1 до или приблизительно до 2,5:1.

[001148] В еще одном варианте осуществления изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих абзацев, как применимо выше, модифицированный таким образом, что соотношение количества АПК, добавляемых при быстрой второй экспансии, к количеству АПК, добавляемых на этапе (b), выбрано из диапазона от или приблизительно от 1,1:1 до или приблизительно до 2,4:1.

[001149] В еще одном варианте осуществления изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих абзацев, как применимо выше, модифицированный таким образом, что соотношение количества АПК, добавляемых при быстрой второй экспансии, к количеству АПК, добавляемых на этапе (b), выбрано из диапазона от или приблизительно от 1,1:1 до или приблизительно до 2,3:1.

[001150] В еще одном варианте осуществления изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих абзацев, как применимо выше, модифицированный таким образом, что соотношение количества АПК, добавляемых при быстрой второй экспансии, к количеству АПК, добавляемых на этапе (b), выбрано из диапазона от или приблизительно от 1,1:1 до или приблизительно до 2,2:1.

[001151] В еще одном варианте осуществления изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих абзацев, как применимо выше, модифицированный таким образом, что соотношение количества АПК, добавляемых при быстрой второй экспансии, к количеству АПК, добавляемых на этапе (b), выбрано из диапазона от или приблизительно от 1,1:1 до или приблизительно до 2,1:1.

[001152] В еще одном варианте осуществления изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих абзацев, как применимо выше, модифицированный таким образом, что соотношение количества АПК, добавляемых при быстрой второй экспансии, к количеству АПК, добавляемых на этапе (b), выбрано из диапазона от или приблизительно от 1,1:1 до или приблизительно до 2:1.

[001153] В еще одном варианте осуществления изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих абзацев, как применимо выше, модифицированный таким образом, что соотношение количества АПК, добавляемых при быстрой второй экспансии, к количеству АПК, добавляемых на этапе (b), выбрано из диапазона от или приблизительно от 2:1 до или приблизительно до 10:1.

[001154] В еще одном варианте осуществления изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих абзацев, как применимо выше, модифицированный таким образом, что соотношение количества АПК, добавляемых при быстрой второй экспансии, к количеству АПК, добавляемых на этапе (b), выбрано из диапазона от или приблизительно от 2:1 до или приблизительно до 5:1.

[001155] В еще одном варианте осуществления изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих абзацев, как применимо выше, модифицированный

таким образом, что соотношение количества АПК, добавляемых при быстрой второй экспансии, к количеству АПК, добавляемых на этапе (b), выбрано из диапазона от или приблизительно от 2:1 до или приблизительно до 4:1.

[001156] В еще одном варианте осуществления изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих абзацев, как применимо выше, модифицированный таким образом, что соотношение количества АПК, добавляемых при быстрой второй экспансии, к количеству АПК, добавляемых на этапе (b), выбрано из диапазона от или приблизительно от 2:1 до или приблизительно до 3:1.

[001157] В еще одном варианте осуществления изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих абзацев, как применимо выше, модифицированный таким образом, что соотношение количества АПК, добавляемых при быстрой второй экспансии, к количеству АПК, добавляемых на этапе (b), выбрано из диапазона от или приблизительно от 2:1 до или приблизительно до 2,9:1.

[001158] В еще одном варианте осуществления изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих абзацев, как применимо выше, модифицированный таким образом, что соотношение количества АПК, добавляемых при быстрой второй экспансии, к количеству АПК, добавляемых на этапе (b), выбрано из диапазона от или приблизительно от 2:1 до или приблизительно до 2,8:1.

[001159] В еще одном варианте осуществления изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих абзацев, как применимо выше, модифицированный таким образом, что соотношение количества АПК, добавляемых при быстрой второй экспансии, к количеству АПК, добавляемых на этапе (b), выбрано из диапазона от или приблизительно от 2:1 до или приблизительно до 2,7:1.

[001160] В еще одном варианте осуществления изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих абзацев, как применимо выше, модифицированный таким образом, что соотношение количества АПК, добавляемых при быстрой второй экспансии, к количеству АПК, добавляемых на этапе (b), выбрано из диапазона от или приблизительно от 2:1 до или приблизительно до 2,6:1.

[001161] В еще одном варианте осуществления изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих абзацев, как применимо выше, модифицированный таким образом, что соотношение количества АПК, добавляемых при быстрой второй экспансии, к количеству АПК, добавляемых на этапе (b), выбрано из диапазона от или приблизительно от 2:1 до или приблизительно до 2,5:1.

[001162] В еще одном варианте осуществления изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих абзацев, как применимо выше, модифицированный таким образом, что соотношение количества АПК, добавляемых при быстрой второй экспансии, к количеству АПК, добавляемых на этапе (b), выбрано из диапазона от или приблизительно от 2:1 до или приблизительно до 2,4:1.

[001163] В еще одном варианте осуществления изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих абзацев, как применимо выше, модифицированный

таким образом, что соотношение количества АПК, добавляемых при быстрой второй экспансии, к количеству АПК, добавляемых на этапе (b), выбрано из диапазона от или приблизительно от 2:1 до или приблизительно до 2,3:1.

[001164] В еще одном варианте осуществления изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих абзацев, как применимо выше, модифицированный таким образом, что соотношение количества АПК, добавляемых при быстрой второй экспансии, к количеству АПК, добавляемых на этапе (b), выбрано из диапазона от или приблизительно от 2:1 до или приблизительно до 2,2:1.

[001165] В еще одном варианте осуществления изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих абзацев, как применимо выше, модифицированный таким образом, что соотношение количества АПК, добавляемых при быстрой второй экспансии, к количеству АПК, добавляемых на этапе (b), выбрано из диапазона от или приблизительно от 2:1 до или приблизительно до 2,1:1.

[001166] В еще одном варианте осуществления изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих абзацев, как применимо выше, модифицированный таким образом, что соотношение количества АПК, добавляемых при быстрой второй экспансии, к количеству АПК, добавляемых на этапе (b), составляет или приблизительно составляет 2:1.

[001167] В еще одном варианте осуществления изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих абзацев, как применимо выше, модифицированный таким образом, что соотношение количества АПК, добавляемых при быстрой второй экспансии, к количеству АПК, добавляемых на этапе (b), составляет или приблизительно составляет 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.

[001168] В еще одном варианте осуществления изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих абзацев, как применимо выше, модифицированный таким образом, что количество АПК, добавляемых при примирующей первой экспансии, составляет или приблизительно составляет 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 количество АПК, добавляемых при быстрой второй экспансии, составляет или приблизительно составляет $3,5\times10^8$, $3,6\times10^8$, $3,7\times10^8$, $3,8\times10^8$, $3,9\times10^8$, 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.

[001169] В еще одном варианте осуществления изобретения предложен способ,

описанный в любом из предыдущих абзацев, как применимо выше, модифицированный таким образом, что количество АПК, добавляемых при примирующей первой экспансии, выбрано из диапазона от или приблизительно от 1×10^8 АПК до или приблизительно до $3,5\times10^8$ АПК, и где количество АПК, добавляемых при быстрой второй экспансии, выбрано из диапазона от или приблизительно от $3,5\times10^8$ АПК до или приблизительно до 1×10^9 АПК.

[001170] В еще одном варианте осуществления изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих абзацев, как применимо выше, модифицированный таким образом, что количество АПК, добавляемых при примирующей первой экспансии, выбрано из диапазона от или приблизительно от $1,5\times10^8$ АПК до или приблизительно до 3×10^8 АПК, и где количество АПК, добавляемых при быстрой второй экспансии, выбрано из диапазона от или приблизительно от 4×10^8 АПК до или приблизительно $7,5\times10^8$ АПК.

[001171] В еще одном варианте осуществления изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих абзацев, как применимо выше, модифицированный таким образом, что количество АПК, добавляемых при примирующей первой экспансии, выбрано из диапазона от или приблизительно от 2×10^8 АПК до или приблизительно до $2,5\times10^8$ АПК, и где количество АПК, добавляемых при быстрой второй экспансии, выбрано из диапазона от или приблизительно от $4,5\times10^8$ АПК до или приблизительно до $5,5\times10^8$ АПК.

[001172] В еще одном варианте осуществления изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих абзацев, как применимо выше, модифицированный таким образом, что при примирующей первой экспансии добавляют или добавляют приблизительно $2,5\times10^8$ АПК, и при быстрой второй экспансии добавляют или добавляют приблизительно 5×10^8 АПК.

[001173] В еще одном варианте осуществления изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих абзацев, как применимо выше, модифицированный таким образом, что антигенпрезентирующие клетки представляют собой мононуклеарные клетки периферической крови (МНПК).

[001174] В еще одном варианте осуществления изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих абзацев, как применимо выше, модифицированный таким образом, что множество фрагментов опухоли распределяют во множество отдельных контейнеров, в каждом из которых получают первую популяцию TIL на этапе (a), получают вторую популяцию TIL на этапе (b), и получают третью популяцию TIL на этапе (c), и терапевтические популяции TIL из множества контейнеров на этапе (c) объединяют с получением собранной популяции TIL из этапа (d).

[001175] В еще одном варианте осуществления изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих абзацев, как применимо выше, модифицированный таким образом, что множество опухолей равномерно распределяют во множество отдельных контейнеров.

[001176] В еще одном варианте осуществления изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих абзацев, как применимо выше, модифицированный

таким образом, что множество отдельных контейнеров включает по меньшей мере два отдельных контейнера.

[001177] В еще одном варианте осуществления изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих абзацев, как применимо выше, модифицированный таким образом, что множество отдельных контейнеров включает от двух до двадцати отдельных контейнеров.

[001178] В еще одном варианте осуществления изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих абзацев, как применимо выше, модифицированный таким образом, что множество отдельных контейнеров включает от двух до пятнадцати отдельных контейнеров.

[001179] В еще одном варианте осуществления изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих абзацев, как применимо выше, модифицированный таким образом, что множество отдельных контейнеров включает от двух до десяти отдельных контейнеров.

[001180] В еще одном варианте осуществления изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих абзацев, как применимо выше, модифицированный таким образом, что множество отдельных контейнеров включает от двух до пяти отдельных контейнеров.

[001181] В еще одном варианте осуществления изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих абзацев, как применимо выше, модифицированный таким образом, что множество отдельных контейнеров включает 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 отдельных контейнеров.

[001182] В еще одном варианте осуществления изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих абзацев, как применимо выше, модифицированный таким образом, что для каждого контейнера, в котором проводят примирующую первую экспансию с первой популяцией TIL на этапе (b), быструю вторую экспансию на этапе (c) проводят в том же контейнере со второй популяцией TIL, полученной из такой первой популяции TIL.

[001183] В еще одном варианте осуществления изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих абзацев, как применимо выше, модифицированный таким образом, что каждый из отдельных контейнеров содержит первую газопроницаемую площадь поверхности.

[001184] В еще одном варианте осуществления изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих абзацев, как применимо выше, модифицированный таким образом, что множество фрагментов опухоли распределяют в одном контейнере.

[001185] В еще одном варианте осуществления изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих абзацев, как применимо выше, модифицированный таким образом, что указанный один контейнер содержит первую газопроницаемую площадь поверхности.

[001186] В еще одном варианте осуществления изобретения предложен способ,

описанный в любом из предыдущих абзацев, как применимо выше, модифицированный таким образом, что на этапе (b) примирующую первую экспансию проводят путем добавления в среду для культивирования клеток первой популяции TIL дополнительных антигенпрезентирующих клеток (АПК), где количество АПК, добавляемых на этапе (c), больше, чем количество АПК, добавляемых на этапе (b), и где на этапе (b) АПК наслаивают на первую газопроницаемую площадь поверхности со средней толщиной от или приблизительно от одного клеточного слоя до или приблизительно до трех клеточных слоев.

[001187] В еще одном варианте осуществления изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих абзацев, как применимо выше, модифицированный таким образом, что на этапе (b) АПК наслаивают на первую газопроницаемую площадь поверхности со средней толщиной от или приблизительно от 1,5 клеточных слоев до или приблизительно до 2,5 клеточных слоев.

[001188] В еще одном варианте осуществления изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих абзацев, как применимо выше, модифицированный таким образом, что на этапе (b) АПК наслаивают на первую газопроницаемую площадь поверхности со средней толщиной, составляющей или приблизительно составляющей 2 клеточных слоя.

[001189] В еще одном варианте осуществления изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих абзацев, как применимо выше, модифицированный таким образом, что на этапе (b) АПК наслаивают на первую газопроницаемую площадь поверхности со средней толщиной, составляющей или приблизительно составляющей 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 клеточных слоя.

[001190] В еще одном варианте осуществления изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих абзацев, как применимо выше, модифицированный таким образом, что на этапе (c) АПК наслаивают на первую газопроницаемую площадь поверхности со средней толщиной от или приблизительно от 3 клеточных слоев до или приблизительно до 10 клеточных слоев.

[001191] В еще одном варианте осуществления изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих абзацев, как применимо выше, модифицированный таким образом, что на этапе (c) АПК наслаивают на первую газопроницаемую площадь поверхности со средней толщиной от или приблизительно от 4 клеточных слоев до или приблизительно до 8 клеточных слоев.

[001192] В еще одном варианте осуществления изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих абзацев, как применимо выше, модифицированный таким образом, что на этапе (c) АПК наслаивают на первую газопроницаемую площадь поверхности со средней толщиной, составляющей или приблизительно составляющей 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 клеточных слоев.

[001193] В еще одном варианте осуществления изобретения предложен способ,

описанный в любом из предыдущих абзацев, как применимо выше, модифицированный таким образом, что на этапе (c) АПК наслаивают на первую газопроницаемую площадь поверхности со средней толщиной, составляющей или приблизительно составляющей 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 клеточных слоев.

[001194] В еще одном варианте осуществления изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих абзацев, как применимо выше, модифицированный таким образом, что на этапе (b) примирующую первую экспансию проводят в первом контейнере, содержащем первую газопроницаемую площадь поверхности, а на этапе (c) быструю вторую экспансию проводят во втором контейнере, содержащем вторую газопроницаемую площадь поверхности.

[001195] В еще одном варианте осуществления изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих абзацев, как применимо выше, модифицированный таким образом, что указанный второй контейнер больше, чем указанный первый контейнер.

[001196] В еще одном варианте осуществления изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих абзацев, как применимо выше, модифицированный таким образом, что на этапе (b) примирующую первую экспансию проводят путем добавления в среду для культивирования клеток первой популяции TIL дополнительных антигенпрезентирующих клеток (АПК), где количество АПК, добавляемых на этапе (c), больше, чем количество АПК, добавляемых на этапе (b), и где на этапе (b) АПК наслаивают на первую газопроницаемую площадь поверхности со средней толщиной от или приблизительно от одного клеточного слоя до или приблизительно до трех клеточных слоев.

[001197] В еще одном варианте осуществления изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих абзацев, как применимо выше, модифицированный таким образом, что на этапе (b) АПК наслаивают на первую газопроницаемую площадь поверхности со средней толщиной от или приблизительно от 1,5 клеточных слоев до или приблизительно до 2,5 клеточных слоев.

[001198] В еще одном варианте осуществления изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих абзацев, как применимо выше, модифицированный таким образом, что на этапе (b) АПК наслаивают на первую газопроницаемую площадь поверхности со средней толщиной, составляющей или приблизительно составляющей 2 клеточных слоя.

[001199] В еще одном варианте осуществления изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих абзацев, как применимо, модифицированный таким образом, что на этапе (b) АПК наслаивают на первую газопроницаемую площадь поверхности со средней толщиной, составляющей или приблизительно составляющей 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 клеточных слоя.

[001200] В еще одном варианте осуществления изобретения предложен способ,

описанный в любом из предыдущих абзацев, как применимо выше, модифицированный таким образом, что на этапе (c) АПК наслаивают на вторую газопроницаемую площадь поверхности со средней толщиной от или приблизительно от 3 клеточных слоев до или приблизительно до 10 клеточных слоев.

[001201] В еще одном варианте осуществления изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих абзацев, как применимо выше, модифицированный таким образом, что на этапе (c) АПК наслаивают на вторую газопроницаемую площадь поверхности со средней толщиной от или приблизительно от 4 клеточных слоев до или приблизительно до 8 клеточных слоев.

[001202] В еще одном варианте осуществления изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих абзацев, как применимо выше, модифицированный таким образом, что на этапе (c) АПК наслаивают на вторую газопроницаемую площадь поверхности со средней толщиной, составляющей или приблизительно составляющей 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 клеточных слоев.

[001203] В еще одном варианте осуществления изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих абзацев, как применимо выше, модифицированный таким образом, что на этапе (c) АПК наслаивают на вторую газопроницаемую площадь поверхности со средней толщиной, составляющей или приблизительно составляющей 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 клеточных слоев.

[001204] В еще одном варианте осуществления изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих абзацев, как применимо выше, модифицированный таким образом, что на этапе (b) примирующую первую экспансию проводят в первом контейнере, содержащем первую газопроницаемую площадь поверхности, а на этапе (c) быструю вторую экспансию проводят в указанном первом контейнере.

[001205] В еще одном варианте осуществления изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих абзацев, как применимо выше, модифицированный таким образом, что на этапе (b) примирующую первую экспансию проводят путем добавления в среду для культивирования клеток первой популяции TIL дополнительных антигенпрезентирующих клеток (АПК), где количество АПК, добавляемых на этапе (c), больше, чем количество АПК, добавляемых на этапе (b), и где на этапе (b) АПК наслаивают на первую газопроницаемую площадь поверхности со средней толщиной от или приблизительно от одного клеточного слоя до или приблизительно до трех клеточных слоев.

[001206] В еще одном варианте осуществления изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих абзацев, как применимо выше, модифицированный таким образом, что на этапе (b) АПК наслаивают на первую газопроницаемую площадь поверхности со средней толщиной от или приблизительно от 1,5 клеточных слоев до или приблизительно до 2,5 клеточных слоев.

[001207] В еще одном варианте осуществления изобретения предложен способ,

описанный в любом из предыдущих абзацев, как применимо выше, модифицированный таким образом, что на этапе (b) АПК наслаивают на первую газопроницаемую площадь поверхности со средней толщиной, составляющей или приблизительно составляющей 2 клеточных слоя.

[001208] В еще одном варианте осуществления изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих абзацев, как применимо выше, модифицированный таким образом, что на этапе (b) АПК наслаивают на первую газопроницаемую площадь поверхности со средней толщиной, составляющей или приблизительно составляющей 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 клеточных слоя.

[001209] В еще одном варианте осуществления изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих абзацев, как применимо выше, модифицированный таким образом, что на этапе (c) АПК наслаивают на первую газопроницаемую площадь поверхности со средней толщиной от или приблизительно от 3 клеточных слоев до или приблизительно до 10 клеточных слоев.

[001210] В еще одном варианте осуществления изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих абзацев, как применимо выше, модифицированный таким образом, что на этапе (c) АПК наслаивают на первую газопроницаемую площадь поверхности со средней толщиной от или приблизительно от 4 клеточных слоев до или приблизительно до 8 клеточных слоев.

[001211] В еще одном варианте осуществления изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих абзацев, как применимо выше, модифицированный таким образом, что на этапе (c) АПК наслаивают на первую газопроницаемую площадь поверхности со средней толщиной, составляющей или приблизительно составляющей 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 клеточных слоев.

[001212] В еще одном варианте осуществления изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих абзацев, как применимо выше, модифицированный таким образом, что на этапе (c) АПК наслаивают на первую газопроницаемую площадь поверхности со средней толщиной, составляющей или приблизительно составляющей 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 клеточных слоев.

[001213] В еще одном варианте осуществления изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих абзацев, как применимо выше, модифицированный таким образом, что на этапе (b) примирующую первую экспансию проводят путем добавления в среду для культивирования клеток первой популяции TIL дополнительных антигенпрезентирующих клеток (АПК), где количество АПК, добавляемых на этапе (c), больше, чем количество АПК, добавляемых на этапе (b), и где соотношение среднего количества слоев АПК, наслоенных на этапе (b), и среднего количества слоев АПК, наслоенных на этапе (c), выбрано из диапазона от или приблизительно от 1:1,1 до или приблизительно до 1:10.

[001214] В еще одном варианте осуществления изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих абзацев, как применимо выше, модифицированный таким образом, что на этапе (b) примирующую первую экспансию проводят путем добавления в среду для культивирования клеток первой популяции TIL дополнительных антигенпрезентирующих клеток (АПК), где количество АПК, добавляемых на этапе (c), больше, чем количество АПК, добавляемых на этапе (b), и где соотношение среднего количества слоев АПК, наслоенных на этапе (b), и среднего количества слоев АПК, наслоенных на этапе (c), выбрано из диапазона от или приблизительно от 1:1,1 до или приблизительно до 1:9.

[001215] В еще одном варианте осуществления изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих абзацев, как применимо выше, модифицированный таким образом, что на этапе (b) примирующую первую экспансию проводят путем добавления в среду для культивирования клеток первой популяции TIL дополнительных антигенпрезентирующих клеток (АПК), где количество АПК, добавляемых на этапе (c), больше, чем количество АПК, добавляемых на этапе (b), и где соотношение среднего количества слоев АПК, наслоенных на этапе (b), и среднего количества слоев АПК, наслоенных на этапе (c), выбрано из диапазона от или приблизительно от 1:1,1 до или приблизительно до 1:8.

[001216] В еще одном варианте осуществления изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих абзацев, как применимо выше, модифицированный таким образом, что на этапе (b) примирующую первую экспансию проводят путем добавления в среду для культивирования клеток первой популяции TIL дополнительных антигенпрезентирующих клеток (АПК), где количество АПК, добавляемых на этапе (c), больше, чем количество АПК, добавляемых на этапе (b), и где соотношение среднего количества слоев АПК, наслоенных на этапе (b), и среднего количества слоев АПК, наслоенных на этапе (c), выбрано из диапазона от или приблизительно от 1:1,1 до или приблизительно до 1:7.

[001217] В еще одном варианте осуществления изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих абзацев, как применимо выше, модифицированный таким образом, что на этапе (b) примирующую первую экспансию проводят путем добавления в среду для культивирования клеток первой популяции TIL дополнительных антигенпрезентирующих клеток (АПК), где количество АПК, добавляемых на этапе (c), больше, чем количество АПК, добавляемых на этапе (b), и где соотношение среднего количества слоев АПК, наслоенных на этапе (b), и среднего количества слоев АПК, наслоенных на этапе (c), выбрано из диапазона от или приблизительно от 1:1,1 до или приблизительно до 1:6.

[001218] В еще одном варианте осуществления изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих абзацев, как применимо выше, модифицированный таким образом, что на этапе (b) примирующую первую экспансию проводят путем добавления в среду для культивирования клеток первой популяции TIL дополнительных

антигенпрезентирующих клеток (АПК), где количество АПК, добавляемых на этапе (c), больше, чем количество АПК, добавляемых на этапе (b), и где соотношение среднего количества слоев АПК, наслоенных на этапе (b), и среднего количества слоев АПК, наслоенных на этапе (c), выбрано из диапазона от или приблизительно от 1:1,1 до или приблизительно до 1:5.

[001219] В еще одном варианте осуществления изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих абзацев, как применимо выше, модифицированный таким образом, что на этапе (b) примирующую первую экспансию проводят путем добавления в среду для культивирования клеток первой популяции TIL дополнительных антигенпрезентирующих клеток (АПК), где количество АПК, добавляемых на этапе (c), больше, чем количество АПК, добавляемых на этапе (b), и где соотношение среднего количества слоев АПК, наслоенных на этапе (b), и среднего количества слоев АПК, наслоенных на этапе (c), выбрано из диапазона от или приблизительно от 1:1,1 до или приблизительно до 1:4.

[001220] В еще одном варианте осуществления изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих абзацев, как применимо выше, модифицированный таким образом, что на этапе (b) примирующую первую экспансию проводят путем добавления в среду для культивирования клеток первой популяции TIL дополнительных антигенпрезентирующих клеток (АПК), где количество АПК, добавляемых на этапе (c), больше, чем количество АПК, добавляемых на этапе (b), и где соотношение среднего количества слоев АПК, наслоенных на этапе (b), и среднего количества слоев АПК, наслоенных на этапе (c), выбрано из диапазона от или приблизительно от 1:1,1 до или приблизительно до 1:3.

[001221] В еще одном варианте осуществления изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих абзацев, как применимо выше, модифицированный таким образом, что на этапе (b) примирующую первую экспансию проводят путем добавления в среду для культивирования клеток первой популяции TIL дополнительных антигенпрезентирующих клеток (АПК), где количество АПК, добавляемых на этапе (c), больше, чем количество АПК, добавляемых на этапе (b), и где соотношение среднего количества слоев АПК, наслоенных на этапе (b), и среднего количества слоев АПК, наслоенных на этапе (c), выбрано из диапазона от или приблизительно от 1:1,1 до или приблизительно до 1:2.

[001222] В еще одном варианте осуществления изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих абзацев, как применимо выше, модифицированный таким образом, что на этапе (b) примирующую первую экспансию проводят путем добавления в среду для культивирования клеток первой популяции TIL дополнительных антигенпрезентирующих клеток (АПК), где количество АПК, добавляемых на этапе (c), больше, чем количество АПК, добавляемых на этапе (b), и где соотношение среднего количества слоев АПК, наслоенных на этапе (b), и среднего количества слоев АПК, наслоенных на этапе (c), выбрано из диапазона от или приблизительно от 1:1,2 до или

приблизительно до 1:8.

[001223] В еще одном варианте осуществления изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих абзацев, как применимо выше, модифицированный таким образом, что на этапе (b) примирующую первую экспансию проводят путем добавления в среду для культивирования клеток первой популяции TIL дополнительных антигенпрезентирующих клеток (АПК), где количество АПК, добавляемых на этапе (c), больше, чем количество АПК, добавляемых на этапе (b), и где соотношение среднего количества слоев АПК, наслоенных на этапе (b), и среднего количества слоев АПК, наслоенных на этапе (c), выбрано из диапазона от или приблизительно от 1:1,3 до или приблизительно до 1:7.

[001224] В еще одном варианте осуществления изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих абзацев, как применимо выше, модифицированный таким образом, что на этапе (b) примирующую первую экспансию проводят путем добавления в среду для культивирования клеток первой популяции TIL дополнительных антигенпрезентирующих клеток (АПК), где количество АПК, добавляемых на этапе (c), больше, чем количество АПК, добавляемых на этапе (b), и где соотношение среднего количества слоев АПК, наслоенных на этапе (b), и среднего количества слоев АПК, наслоенных на этапе (c), выбрано из диапазона от или приблизительно от 1:1,4 до или приблизительно до 1:6.

[001225] В еще одном варианте осуществления изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих абзацев, как применимо выше, модифицированный таким образом, что на этапе (b) примирующую первую экспансию проводят путем добавления в среду для культивирования клеток первой популяции TIL дополнительных антигенпрезентирующих клеток (АПК), где количество АПК, добавляемых на этапе (c), больше, чем количество АПК, добавляемых на этапе (b), и где соотношение среднего количества слоев АПК, наслоенных на этапе (b), и среднего количества слоев АПК, наслоенных на этапе (c), выбрано из диапазона от или приблизительно от 1:1,5 до или приблизительно до 1:5.

[001226] В еще одном варианте осуществления изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих абзацев, как применимо выше, модифицированный таким образом, что на этапе (b) примирующую первую экспансию проводят путем добавления в среду для культивирования клеток первой популяции TIL дополнительных антигенпрезентирующих клеток (АПК), где количество АПК, добавляемых на этапе (c), больше, чем количество АПК, добавляемых на этапе (b), и где соотношение среднего количества слоев АПК, наслоенных на этапе (b), и среднего количества слоев АПК, наслоенных на этапе (c), выбрано из диапазона от или приблизительно от 1:1,6 до или приблизительно до 1:4.

[001227] В еще одном варианте осуществления изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих абзацев, как применимо выше, модифицированный таким образом, что на этапе (b) примирующую первую экспансию проводят путем

добавления в среду для культивирования клеток первой популяции TIL дополнительных антигенпрезентирующих клеток (АПК), где количество АПК, добавляемых на этапе (c), больше, чем количество АПК, добавляемых на этапе (b), и где соотношение среднего количества слоев АПК, наслоенных на этапе (b), и среднего количества слоев АПК, наслоенных на этапе (c), выбрано из диапазона от или приблизительно от 1:1,7 до или приблизительно до 1:3,5.

[001228] В еще одном варианте осуществления изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих абзацев, как применимо выше, модифицированный таким образом, что на этапе (b) примирующую первую экспансию проводят путем добавления в среду для культивирования клеток первой популяции TIL дополнительных антигенпрезентирующих клеток (АПК), где количество АПК, добавляемых на этапе (c), больше, чем количество АПК, добавляемых на этапе (b), и где соотношение среднего количества слоев АПК, наслоенных на этапе (b), и среднего количества слоев АПК, наслоенных на этапе (c), выбрано из диапазона от или приблизительно от 1:1,8 до или приблизительно до 1:3.

[001229] В еще одном варианте осуществления изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих абзацев, как применимо выше, модифицированный таким образом, что на этапе (b) примирующую первую экспансию проводят путем добавления в среду для культивирования клеток первой популяции TIL дополнительных антигенпрезентирующих клеток (АПК), где количество АПК, добавляемых на этапе (c), больше, чем количество АПК, добавляемых на этапе (b), и где соотношение среднего количества слоев АПК, наслоенных на этапе (b), и среднего количества слоев АПК, наслоенных на этапе (c), выбрано из диапазона от или приблизительно от 1:1,9 до или приблизительно до 1:2,5.

[001230] В еще одном варианте осуществления изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих абзацев, как применимо выше, модифицированный таким образом, что на этапе (b) примирующую первую экспансию проводят путем добавления в среду для культивирования клеток первой популяции TIL дополнительных антигенпрезентирующих клеток (АПК), где количество АПК, добавляемых на этапе (c), больше, чем количество АПК, добавляемых на этапе (b), и где соотношение среднего количества слоев АПК, наслоенных на этапе (b), и среднего количества слоев АПК, наслоенных на этапе (c), выбрано из диапазона от или приблизительно от 1:2.

[001231] В еще одном варианте осуществления изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих абзацев, как применимо выше, модифицированный таким образом, что на этапе (b) примирующую первую экспансию проводят путем добавления в среду для культивирования клеток первой популяции TIL дополнительных антигенпрезентирующих клеток (АПК), где количество АПК, добавляемых на этапе (c), больше, чем количество АПК, добавляемых на этапе (b), и где соотношение среднего количества слоев АПК, наслоенных на этапе (b), и среднего количества слоев АПК, наслоенных на этапе (c), выбрано из или приблизительно из 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.

[001232] В еще одном варианте осуществления изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих абзацев, как применимо выше, модифицированный таким образом, что соотношение количества TIL во второй популяции TIL и количества TIL в первой популяции TIL составляет от или приблизительно от 1,5:1 до или приблизительно до 100:1.

[001233] В еще одном варианте осуществления изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих абзацев, как применимо выше, модифицированный таким образом, что соотношение количества TIL во второй популяции TIL и количества TIL в первой популяции TIL составляет или приблизительно составляет 50:1.

[001234] В еще одном варианте осуществления изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих абзацев, как применимо выше, модифицированный таким образом, что соотношение количества TIL во второй популяции TIL и количества TIL в первой популяции TIL составляет или приблизительно составляет 25:1.

[001235] В еще одном варианте осуществления изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих абзацев, как применимо выше, модифицированный таким образом, что соотношение количества TIL во второй популяции TIL и количества TIL в первой популяции TIL составляет или приблизительно составляет 20:1.

[001236] В еще одном варианте осуществления изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих абзацев, как применимо выше, модифицированный таким образом, что соотношение количества TIL во второй популяции TIL и количества TIL в первой популяции TIL составляет или приблизительно составляет 10:1.

[001237] В еще одном варианте осуществления изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих абзацев, как применимо выше, модифицированный таким образом, что вторая популяция TIL по меньшей мере или по меньшей мере приблизительно в 50 раз больше по численности, чем первая популяция TIL.

[001238] В еще одном варианте осуществления изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих абзацев, как применимо выше, модифицированный таким образом, что вторая популяция TIL по меньшей мере или по меньшей мере 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 по численности, чем первая популяция TIL.

[001239] В еще одном варианте осуществления изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих абзацев, как применимо выше, модифицированный таким образом, что через или приблизительно через 2 дня, или через или приблизительно

через 3 дня после начала второго периода на этапе (c) в среду для культивирования клеток добавляют добавку IL-2.

[001240] В еще одном варианте осуществления изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих абзацев, как применимо выше, модифицированный таким образом, что он дополнительно включает этап криоконсервации собранной популяции TIL на этапе (d) с использованием процесса криоконсервации.

[001241] В еще одном варианте осуществления изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих абзацев, как применимо выше, модифицированный таким образом, что он включает после этапа (d) проведение дополнительного этапа (e) переноса собранной популяции TIL из этапа (d) в пакет для инфузии, который необязательно содержит HypoThermosol.

[001242] В еще одном варианте осуществления изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих абзацев, как применимо выше, модифицированный таким образом, что он включает этап криоконсервации пакета для инфузии, содержащего собранную популяцию TIL, на этапе (e) с использованием процесса криоконсервации.

[001243] В еще одном варианте осуществления изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих абзацев, как применимо выше, модифицированный таким образом, что процесс криоконсервации проводят с использованием соотношения собранной популяции TIL и среды для криоконсервации, составляющего 1:1.

[001244] В еще одном варианте осуществления изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих абзацев, как применимо выше, модифицированный таким образом, что антигенпрезентирующие клетки представляют собой мононуклеарные клетки периферической крови (МНПК).

[001245] В еще одном варианте осуществления изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих абзацев, как применимо выше, модифицированный таким образом, что МНПК являются облученными и аллогенными.

[001246] В еще одном варианте осуществления изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих абзацев, как применимо выше, модифицированный таким образом, что общее количество АПК, добавляемых в клеточную культуру на этапе (b), составляет $2,5 \times 10^8$.

[001247] В еще одном варианте осуществления изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих абзацев, как применимо выше, модифицированный таким образом, что общее количество АПК, добавляемых в клеточную культуру на этапе (c), составляет 5×10^8.

[001248] В еще одном варианте осуществления изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих абзацев, как применимо выше, модифицированный таким образом, что АПК представляют собой МНПК.

[001249] В еще одном варианте осуществления изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих абзацев, как применимо выше, модифицированный таким образом, что МНПК являются облученными и аллогенными.

[001250] В еще одном варианте осуществления изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих абзацев, как применимо выше, модифицированный таким образом, что антигенпрезентирующие клетки представляют собой искусственные антигенпрезентирующие клетки.

[001251] В еще одном варианте осуществления изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих абзацев, как применимо выше, модифицированный таким образом, что сбор на этапе (d) проводят с использованием мембранной системы обработки клеток.

[001252] В еще одном варианте осуществления изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих абзацев, как применимо выше, модифицированный таким образом, что сбор на этапе (d) проводят с использованием системы обработки клеток LOVO.

[001253] В еще одном варианте осуществления изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих абзацев, как применимо выше, модифицированный таким образом, что множество фрагментов включает от или приблизительно от 5 до или приблизительно до 60 фрагментов на контейнер на этапе (b).

[001254] В еще одном варианте осуществления изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих абзацев, как применимо выше, модифицированный таким образом, что множество фрагментов включает от или приблизительно от 10 до или приблизительно до 60 фрагментов на контейнер на этапе (b).

[001255] В еще одном варианте осуществления изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих абзацев, как применимо выше, модифицированный таким образом, что множество фрагментов включает от или приблизительно от 15 до или приблизительно до 60 фрагментов на контейнер на этапе (b).

[001256] В еще одном варианте осуществления изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих абзацев, как применимо выше, модифицированный таким образом, что множество фрагментов включает от или приблизительно от 20 до или приблизительно до 60 фрагментов на контейнер на этапе (b).

[001257] В еще одном варианте осуществления изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих абзацев, как применимо выше, модифицированный таким образом, что множество фрагментов включает от или приблизительно от 25 до или приблизительно до 60 фрагментов на контейнер на этапе (b).

[001258] В еще одном варианте осуществления изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих абзацев, как применимо выше, модифицированный таким образом, что множество фрагментов включает от или приблизительно от 30 до или приблизительно до 60 фрагментов на контейнер на этапе (b).

[001259] В еще одном варианте осуществления изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих абзацев, как применимо выше, модифицированный таким образом, что множество фрагментов включает от или приблизительно от 35 до или приблизительно до 60 фрагментов на контейнер на этапе (b).

[001260] В еще одном варианте осуществления изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих абзацев, как применимо выше, модифицированный таким образом, что множество фрагментов включает от или приблизительно от 40 до или приблизительно до 60 фрагментов на контейнер на этапе (b).

[001261] В еще одном варианте осуществления изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих абзацев, как применимо выше, модифицированный таким образом, что множество фрагментов включает от или приблизительно от 45 до или приблизительно до 60 фрагментов на контейнер на этапе (b).

[001262] В еще одном варианте осуществления изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих абзацев, как применимо выше, модифицированный таким образом, что множество фрагментов включает от или приблизительно от 50 до или приблизительно до 60 фрагментов на контейнер на этапе (b).

[001263] В еще одном варианте осуществления изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих абзацев, как применимо выше, модифицированный таким образом, что множество фрагментов включает или приблизительно включает 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 фрагмента(ов) на контейнер на этапе (b).

[001264] В еще одном варианте осуществления изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих абзацев, как применимо выше, модифицированный таким образом, что каждый фрагмент имеет объем, равный или приблизительно равный 27 $мм^3$.

[001265] В еще одном варианте осуществления изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих абзацев, как применимо выше, модифицированный таким образом, что каждый фрагмент имеет объем от или приблизительно от 20 $мм^3$ до или приблизительно до 50 $мм^3$.

[001266] В еще одном варианте осуществления изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих абзацев, как применимо выше, модифицированный таким образом, что каждый фрагмент имеет объем от или приблизительно от 21 $мм^3$ до или приблизительно до 30 $мм^3$.

[001267] В еще одном варианте осуществления изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих абзацев, как применимо выше, модифицированный таким образом, что каждый фрагмент имеет объем от или приблизительно от 22 $мм^3$ до или приблизительно до 29,5 $мм^3$.

[001268] В еще одном варианте осуществления изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих абзацев, как применимо выше, модифицированный таким образом, что каждый фрагмент имеет объем от или приблизительно от 23 $мм^3$ до или приблизительно до 29 $мм^3$.

[001269] В еще одном варианте осуществления изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих абзацев, как применимо выше, модифицированный

таким образом, что каждый фрагмент имеет объем от или приблизительно от 24 мм^3 до или приблизительно до 28,5 мм^3.

[001270] В еще одном варианте осуществления изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих абзацев, как применимо выше, модифицированный таким образом, что каждый фрагмент имеет объем от или приблизительно от 25 мм^3 до или приблизительно до 28 мм^3.

[001271] В еще одном варианте осуществления изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих абзацев, как применимо выше, модифицированный таким образом, что каждый фрагмент имеет объем от или приблизительно от 26,5 мм^3 до или приблизительно до 27,5 мм^3.

[001272] В еще одном варианте осуществления изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих абзацев, как применимо выше, модифицированный таким образом, что каждый фрагмент имеет объем, равный или приблизительно равный 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.

[001273] В еще одном варианте осуществления изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих абзацев, как применимо выше, модифицированный таким образом, что множество фрагментов включает от или приблизительно от 30 до или приблизительно до 60 фрагментов с суммарным объемом от или приблизительно от 1300 мм^3 до или приблизительно до 1500 мм^3.

[001274] В еще одном варианте осуществления изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих абзацев, как применимо выше, модифицированный таким образом, что множество фрагментов включает или приблизительно включает 50 фрагментов с суммарным объемом, равным или приблизительно равным 1350 мм^3.

[001275] В еще одном варианте осуществления изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих абзацев, как применимо выше, модифицированный таким образом, что множество фрагментов включает или приблизительно включает 50 фрагментов с суммарной массой от или приблизительно от 1 грамма до или приблизительно до 1,5 грамм.

[001276] В еще одном варианте осуществления изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих абзацев, как применимо выше, модифицированный таким образом, что среда для культивирования клеток предоставлена в контейнере, который представляет собой G-контейнер или Xuri cellbag.

[001277] В еще одном варианте осуществления изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих абзацев, как применимо выше, модифицированный таким образом, что концентрация IL-2 в среде для культивирования клеток составляет от приблизительно 10000 МЕ/мл до приблизительно 5000 МЕ/мл.

[001278] В еще одном варианте осуществления изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих абзацев, как применимо выше, модифицированный таким образом, что концентрация IL-2 в среде для культивирования клеток составляет

приблизительно 6000 МЕ/мл.

[001279] В еще одном варианте осуществления изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих абзацев, как применимо выше, модифицированный таким образом, что среда для криоконсервации содержит диметилсульфоксид (ДМСО).

[001280] В еще одном варианте осуществления изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих абзацев, как применимо выше, модифицированный таким образом, что среда для криоконсервации содержит от 7% до 10% ДМСО.

[001281] В еще одном варианте осуществления изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих абзацев, как применимо выше, модифицированный таким образом, что первый период на этапе (b) проводят в течение или приблизительно в течение 1 дня, 2 дней, 3 дней, 4 дней, 5 дней, 6 дней или 7 дней.

[001282] В еще одном варианте осуществления изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих абзацев, как применимо выше, модифицированный таким образом, что второй период на этапе (c) проводят в течение или приблизительно в течение 1 дня, 2 дней, 3 дней, 4 дней, 5 дней, 6 дней, 7 дней, 8 дней, 9 дней, 10 дней или 11 дней.

[001283] В еще одном варианте осуществления изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих абзацев, как применимо выше, модифицированный таким образом, что первый период на этапе (b) и второй период на этапе (c) каждый в отдельности проводят в течение или приблизительно в течение 1 дня, 2 дней, 3 дней, 4 дней, 5 дней, 6 дней или 7 дней.

[001284] В еще одном варианте осуществления изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих абзацев, как применимо выше, модифицированный таким образом, что первый период на этапе (b) и второй период на этапе (c) каждый в отдельности проводят в течение или приблизительно в течение 5 дней, 6 дней или 7 дней.

[001285] В еще одном варианте осуществления изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих абзацев, как применимо выше, модифицированный таким образом, что первый период на этапе (b) и второй период на этапе (c) каждый в отдельности проводят в течение или приблизительно в течение 7 дней.

[001286] В еще одном варианте осуществления изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих абзацев, как применимо выше, модифицированный таким образом, что этапы с (a) по (d) проводят в течение в общей сложности от или приблизительно от 14 дней до или приблизительно до 18 дней.

[001287] В еще одном варианте осуществления изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих абзацев, как применимо выше, модифицированный таким образом, что этапы с (a) по (d) проводят в течение в общей сложности от или приблизительно от 15 дней до или приблизительно до 18 дней.

[001288] В еще одном варианте осуществления изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих абзацев, как применимо выше, модифицированный таким образом, что этапы с (a) по (d) проводят в течение в общей сложности от или

приблизительно от 16 дней до или приблизительно до 18 дней.

[001289] В еще одном варианте осуществления изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих абзацев, как применимо выше, модифицированный таким образом, что этапы с (a) по (d) проводят в течение в общей сложности от или приблизительно от 14 дней до или приблизительно до 17 дней.

[001290] В еще одном варианте осуществления изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих абзацев, как применимо выше, модифицированный таким образом, что этапы с (a) по (d) проводят в течение в общей сложности от или приблизительно от 15 дней до или приблизительно до 17 дней.

[001291] В еще одном варианте осуществления изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих абзацев, как применимо выше, модифицированный таким образом, что этапы с (a) по (d) проводят в течение в общей сложности от или приблизительно от 14 дней до или приблизительно до 16 дней.

[001292] В еще одном варианте осуществления изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих абзацев, как применимо выше, модифицированный таким образом, что этапы с (a) по (d) проводят в течение в общей сложности от или приблизительно от 15 дней до или приблизительно до 16 дней.

[001293] В еще одном варианте осуществления изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих абзацев, как применимо выше, модифицированный таким образом, что этапы с (a) по (d) проводят в течение в общей сложности или приблизительно 14 дней.

[001294] В еще одном варианте осуществления изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих абзацев, как применимо выше, модифицированный таким образом, что этапы с (a) по (d) проводят в течение в общей сложности или приблизительно 15 дней.

[001295] В еще одном варианте осуществления изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих абзацев, как применимо выше, модифицированный таким образом, что этапы с (a) по (d) проводят в течение в общей сложности или приблизительно 16 дней.

[001296] В еще одном варианте осуществления изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих абзацев, как применимо выше, модифицированный таким образом, что этапы с (a) по (d) проводят в течение в общей сложности или приблизительно 17 дней.

[001297] В еще одном варианте осуществления изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих абзацев, как применимо выше, модифицированный таким образом, что этапы с (a) по (d) проводят в течение в общей сложности или приблизительно 18 дней.

[001298] В еще одном варианте осуществления изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих абзацев, как применимо выше, модифицированный таким образом, что этапы с (a) по (d) проводят в течение в общей сложности или

приблизительно 14 дней, или менее.

[001299] В еще одном варианте осуществления изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих абзацев, как применимо выше, модифицированный таким образом, что этапы с (a) по (d) проводят в течение в общей сложности или приблизительно 15 дней, или менее.

[001300] В еще одном варианте осуществления изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих абзацев, как применимо выше, модифицированный таким образом, что этапы с (a) по (d) проводят в течение в общей сложности или приблизительно 16 дней, или менее.

[001301] В еще одном варианте осуществления изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих абзацев, как применимо выше, модифицированный таким образом, что этапы с (a) по (d) проводят в течение в общей сложности или приблизительно 17 дней, или менее.

[001302] В еще одном варианте осуществления изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих абзацев, как применимо выше, модифицированный таким образом, что этапы с (a) по (d) проводят в течение в общей сложности или приблизительно 18 дней, или менее.

[001303] В еще одном варианте осуществления изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих абзацев, как применимо выше, модифицированный таким образом, что терапевтическая популяция TIL, собранная на этапе (d), содержит достаточное количество TIL для терапевтически эффективной дозировки TIL.

[001304] В еще одном варианте осуществления изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих абзацев, как применимо выше, модифицированный таким образом, что количество TIL, достаточное для терапевтически эффективной дозировки, составляет от или приблизительно от $2,3\times10^{10}$ до или приблизительно до $13,7\times10^{10}$.

[001305] В еще одном варианте осуществления изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих абзацев, как применимо выше, модифицированный таким образом, что третья популяция TIL на этапе (c) обеспечивает повышенную эффективность, повышенную продукцию интерферона-гамма и/или повышенную поликлональность.

[001306] В еще одном варианте осуществления изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих абзацев, как применимо выше, модифицированный таким образом, что третья популяция TIL на этапе (c) обеспечивает по меньшей мере в 1-5 или более раз более высокую продукцию интерферона-гамма по сравнению с TIL, полученными с помощью процесса, длящегося более 16 дней.

[001307] В еще одном варианте осуществления изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих абзацев, как применимо выше, модифицированный таким образом, что третья популяция TIL на этапе (c) обеспечивает по меньшей мере в 1-5 или более раз более высокую продукцию интерферона-гамма по сравнению с TIL,

полученными с помощью процесса, длящегося более 17 дней.

[001308] В еще одном варианте осуществления изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих абзацев, как применимо выше, модифицированный таким образом, что третья популяция TIL на этапе (c) обеспечивает по меньшей мере в 1-5 или более раз более высокую продукцию интерферона-гамма по сравнению с TIL, полученными с помощью процесса, длящегося более 18 дней.

[001309] В еще одном варианте осуществления изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих абзацев, как применимо выше, модифицированный таким образом, что эффекторные Т-клетки и/или Т-клетки центральной памяти, полученные из третьей популяции TIL из этапа (c), демонстрируют повышенную экспрессию CD8 и CD28 относительно эффекторных Т-клеток и/или Т-клеток центральной памяти, полученных из второй популяции клеток из этапа (b).

[001310] В еще одном варианте осуществления изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих абзацев, как применимо выше, модифицированный таким образом, что каждый контейнер, перечисленный в способе, представляет собой закрытый контейнер.

[001311] В еще одном варианте осуществления изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих абзацев, как применимо выше, модифицированный таким образом, что каждый контейнер, перечисленный в способе, представляет собой G-контейнер.

[001312] В еще одном варианте осуществления изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих абзацев, как применимо выше, модифицированный таким образом, что каждый контейнер, перечисленный в способе, представляет собой GREX-10.

[001313] В еще одном варианте осуществления изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих абзацев, как применимо выше, модифицированный таким образом, что каждый контейнер, перечисленный в способе, представляет собой GREX-100.

[001314] В еще одном варианте осуществления изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих абзацев, как применимо выше, модифицированный таким образом, что каждый контейнер, перечисленный в способе, представляет собой GREX-500.

[001315] В еще одном варианте осуществления изобретения предложена терапевтическая популяция опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов (TIL), полученная способом, описанным в любом из предыдущих абзацев, как применимо выше.

[001316] В еще одном варианте осуществления изобретения предложена терапевтическая популяция опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов (TIL), полученная из опухолевой ткани пациента, где терапевтическая популяция TIL обеспечивает повышенную эффективность, повышенную продукцию интерферона-гамма и/или повышенную поликлональность по сравнению с TIL, полученными с помощью процесса, в

котором первая экспансия TIL проводится без каких-либо добавок антигенпрезентирующих клеток (АПК) или OKT3.

[001317] В еще одном варианте осуществления изобретения предложена терапевтическая популяция опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов (TIL), полученная из опухолевой ткани пациента, где терапевтическая популяция TIL обеспечивает повышенную эффективность, повышенную продукцию интерферона-гамма и/или повышенную поликлональность по сравнению с TIL, полученными с помощью процесса, в котором первая экспансия TIL проводится без каких-либо добавок антигенпрезентирующих клеток (АПК).

[001318] В еще одном варианте осуществления изобретения предложена терапевтическая популяция опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов (TIL), полученная из опухолевой ткани пациента, где терапевтическая популяция TIL обеспечивает повышенную эффективность, повышенную продукцию интерферона-гамма и/или повышенную поликлональность по сравнению с TIL, полученными с помощью процесса, в котором первая экспансия TIL проводится без каких-либо добавок OKT3.

[001319] В еще одном варианте осуществления изобретения предложена терапевтическая популяция опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов (TIL), полученная из опухолевой ткани пациента, где терапевтическая популяция TIL обеспечивает повышенную эффективность, повышенную продукцию интерферона-гамма и/или повышенную поликлональность по сравнению с TIL, полученными с помощью процесса, в котором первая экспансия TIL проводится без добавок антигенпрезентирующих клеток (АПК) и без добавок OKT3.

[001320] В еще одном варианте осуществления изобретения предложена терапевтическая популяция опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов (TIL), полученная из опухолевой ткани пациента, где терапевтическая популяция TIL обеспечивает повышенную эффективность, повышенную продукцию интерферона-гамма и/или повышенную поликлональность по сравнению с TIL, полученными с помощью процесса, длящегося более 16 дней.

[001321] В еще одном варианте осуществления изобретения предложена терапевтическая популяция опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов (TIL), полученная из опухолевой ткани пациента, где терапевтическая популяция TIL обеспечивает повышенную эффективность, повышенную продукцию интерферона-гамма и/или повышенную поликлональность по сравнению с TIL, полученными с помощью процесса, длящегося более 17 дней.

[001322] В еще одном варианте осуществления изобретения предложена терапевтическая популяция опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов (TIL), полученная из опухолевой ткани пациента, где терапевтическая популяция TIL обеспечивает повышенную эффективность, повышенную продукцию интерферона-гамма и/или повышенную поликлональность по сравнению с TIL, полученными с помощью процесса, длящегося более 18 дней.

[001323] В еще одном варианте осуществления изобретения предложена терапевтическая популяция TIL, описанная в любом из предыдущих абзацев, как применимо выше, которая обеспечивает повышенную продукцию интерферона-гамма.

[001324] В еще одном варианте осуществления изобретения предложена терапевтическая популяция TIL, описанная в любом из предыдущих абзацев, как применимо выше, которая обеспечивает повышенную поликлональность.

[001325] В еще одном варианте осуществления изобретения предложена терапевтическая популяция TIL, описанная в любом из предыдущих абзацев, как применимо выше, которая обеспечивает повышенную эффективность.

[001326] В еще одном варианте осуществления изобретения предложена терапевтическая популяция TIL, описанная в любом из предыдущих абзацев, как применимо выше, модифицированная таким образом, что терапевтическая популяция TIL способна обеспечивать по меньшей мере в один раз более высокую продукцию интерферона-гамма по сравнению с TIL, полученными с помощью процесса, длящегося более 16 дней. В еще одном варианте осуществления изобретения предложена терапевтическая популяция TIL, описанная в любом из предыдущих абзацев, как применимо выше, модифицированная таким образом, что терапевтическая популяция TIL способна обеспечивать по меньшей мере в один раз более высокую продукцию интерферона-гамма по сравнению с TIL, полученными с помощью процесса, длящегося более 17 дней. В еще одном варианте осуществления изобретения предложена терапевтическая популяция TIL, описанная в любом из предыдущих абзацев, как применимо выше, модифицированная таким образом, что терапевтическая популяция TIL способна обеспечивать по меньшей мере в один раз более высокую продукцию интерферона-гамма по сравнению с TIL, полученными с помощью процесса, длящегося более 18 дней. В некоторых вариантах осуществления TIL становятся способными обеспечивать по меньшей мере в один раз более высокую продукцию интерферона-гамма благодаря процессу экспансии, описанному в настоящем документе, например, как описано на этапах с A по F выше, или в соответствии с этапами с A по F выше (также как показано, например, на фиг. 1 (в частности, например, на фиг. 1B и/или фиг. 1C).

[001327] В еще одном варианте осуществления изобретения предложена терапевтическая популяция TIL, описанная в любом из предыдущих абзацев, как применимо выше, модифицированная таким образом, что терапевтическая популяция TIL способна обеспечивать по меньшей мере в два раза более высокую продукцию интерферона-гамма по сравнению с TIL, полученными с помощью процесса, длящегося более 16 дней. В еще одном варианте осуществления изобретения предложена терапевтическая популяция TIL, описанная в любом из предыдущих абзацев, как применимо выше, модифицированная таким образом, что терапевтическая популяция TIL способна обеспечивать по меньшей мере в два раза более высокую продукцию интерферона-гамма по сравнению с TIL, полученными с помощью процесса, длящегося более 17 дней. В еще одном варианте осуществления изобретения предложена

терапевтическая популяция TIL, описанная в любом из предыдущих абзацев, как применимо выше, модифицированная таким образом, что терапевтическая популяция TIL способна обеспечивать по меньшей мере в два раза более высокую продукцию интерферона-гамма по сравнению с TIL, полученными с помощью процесса, длящегося более 18 дней. В некоторых вариантах осуществления TIL становятся способными обеспечивать по меньшей мере в два раза более высокую продукцию интерферона-гамма благодаря процессу экспансии, описанному в настоящем документе, например, как описано на этапах с A по F выше, или в соответствии с этапами с A по F выше (также как показано, например, на фиг. 1 (в частности, например, на фиг. 1B и/или фиг. 1C).

[001328] В еще одном варианте осуществления изобретения предложена терапевтическая популяция TIL, описанная в любом из предыдущих абзацев, как применимо выше, модифицированная таким образом, что терапевтическая популяция TIL способна обеспечивать по меньшей мере в три раза более высокую продукцию интерферона-гамма по сравнению с TIL, полученными с помощью процесса, длящегося более 16 дней. В еще одном варианте осуществления изобретения предложена терапевтическая популяция TIL, описанная в любом из предыдущих абзацев, как применимо выше, модифицированная таким образом, что терапевтическая популяция TIL способна обеспечивать по меньшей мере в три раза более высокую продукцию интерферона-гамма по сравнению с TIL, полученными с помощью процесса, длящегося более 17 дней. В еще одном варианте осуществления изобретения предложена терапевтическая популяция TIL, описанная в любом из предыдущих абзацев, как применимо выше, модифицированная таким образом, что терапевтическая популяция TIL способна обеспечивать по меньшей мере в три раза более высокую продукцию интерферона-гамма по сравнению с TIL, полученными с помощью процесса, длящегося более 18 дней. В некоторых вариантах осуществления TIL становятся способными обеспечивать по меньшей мере в три раза более высокую продукцию интерферона-гамма благодаря процессу экспансии, описанному в настоящем документе, например, как описано на этапах с A по F выше, или в соответствии с этапами с A по F выше (также как показано, например, на фиг. 1 (в частности, например, на фиг. 1B и/или фиг. 1C).

[001329] В еще одном варианте осуществления изобретения предложена терапевтическая популяция опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов (TIL), способная обеспечивать по меньшей мере в один раз более высокую продукцию интерферона-гамма по сравнению с TIL, полученными с помощью процесса, в котором первая экспансия TIL проводится без каких-либо добавок антигенпрезентирующих клеток (АПК). В некоторых вариантах осуществления TIL становятся способными обеспечивать по меньшей мере в один раз более высокую продукцию интерферона-гамма благодаря процессу экспансии, описанному в настоящем документе, например, как описано на этапах с A по F выше, или в соответствии с этапами с A по F выше (также как показано, например, на фиг. 1 (в частности, например, на фиг. 1B и/или фиг. 1C).

[001330] В еще одном варианте осуществления изобретения предложена

терапевтическая популяция опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов (TIL), способная обеспечивать по меньшей мере в один раз более высокую продукцию интерферона-гамма по сравнению с TIL, полученными с помощью процесса, в котором первая экспансия TIL проводится без каких-либо добавок OKT3. В некоторых вариантах осуществления TIL становятся способными обеспечивать по меньшей мере в один раз более высокую продукцию интерферона-гамма благодаря процессу экспансии, описанному в настоящем документе, например, как описано на этапах с A по F выше, или в соответствии с этапами с A по F выше (также как показано, например, на фиг. 1 (в частности, например, на фиг. 1B и/или фиг. 1C).

[001331] В еще одном варианте осуществления изобретения предложена терапевтическая популяция TIL, способная обеспечивать по меньшей мере в два раза более высокую продукцию интерферона-гамма по сравнению с TIL, полученными с помощью процесса, в котором первая экспансия TIL проводится без каких-либо добавок АПК.

[001332] В еще одном варианте осуществления изобретения предложена терапевтическая популяция TIL, способная обеспечивать по меньшей мере в два раза более высокую продукцию интерферона-гамма по сравнению с TIL, полученными с помощью процесса, в котором первая экспансия TIL проводится без каких-либо добавок АПК. В некоторых вариантах осуществления TIL становятся способными обеспечивать по меньшей мере в два раза более высокую продукцию интерферона-гамма благодаря процессу экспансии, описанному в настоящем документе, например, как описано на этапах с A по F выше, или в соответствии с этапами с A по F выше (также как показано, например, на фиг. 1 (в частности, например, на фиг. 1B и/или фиг. 1C).

[001333] В еще одном варианте осуществления изобретения предложена терапевтическая популяция TIL, способная обеспечивать по меньшей мере в два раза более высокую продукцию интерферона-гамма по сравнению с TIL, полученными с помощью процесса, в котором первая экспансия TIL проводится без каких-либо добавок OKT3. В некоторых вариантах осуществления TIL становятся способными обеспечивать по меньшей мере в два раза более высокую продукцию интерферона-гамма благодаря процессу экспансии, описанному в настоящем документе, например, как описано на этапах с A по F выше, или в соответствии с этапами с A по F выше (также как показано, например, на фиг. 1 (в частности, например, на фиг. 1B и/или фиг. 1C).

[001334] В еще одном варианте осуществления изобретения предложена терапевтическая популяция TIL, способная обеспечивать по меньшей мере в три раза более высокую продукцию интерферона-гамма по сравнению с TIL, полученными с помощью процесса, в котором первая экспансия TIL проводится без каких-либо добавок АПК. В некоторых вариантах осуществления TIL становятся способными обеспечивать по меньшей мере в один раз более высокую продукцию интерферона-гамма благодаря процессу экспансии, описанному в настоящем документе, например, как описано на этапах с A по F выше, или в соответствии с этапами с A по F выше (также как показано, например, на фиг. 1 (в частности, например, на фиг. 1B и/или фиг. 1C).

[001335] В еще одном варианте осуществления изобретения предложена терапевтическая популяция TIL, способная обеспечивать по меньшей мере в три раза более высокую продукцию интерферона-гамма по сравнению с TIL, полученными с помощью процесса, в котором первая экспансия TIL проводится без каких-либо добавок OKT3. В некоторых вариантах осуществления TIL становятся способными обеспечивать по меньшей мере в три раза более высокую продукцию интерферона-гамма благодаря процессу экспансии, описанному в настоящем документе, например, как описано на этапах с A по F выше, или в соответствии с этапами с A по F выше (также как показано, например, на фиг. 1 (в частности, например, на фиг. 1B и/или фиг. 1C).

[001336] В еще одном варианте осуществления изобретения предложен способ экспансии Т-клеток, включающий: (a) проведение примирующей первой экспансии первой популяции Т-клеток, полученных от донора, путем культивирования первой популяции Т-клеток для обеспечения роста и примирования активации первой популяции Т-клеток; (b) после того, как активация первой популяции Т-клеток, примированных на этапе (a), начинает ослабевать, проведение быстрой второй экспансии первой популяции Т-клеток путем культивирования первой популяции Т-клеток для обеспечения роста и усиления активация первой популяции Т-клеток с получением второй популяции Т-клеток; и (c) сбор второй популяции Т-клеток. В еще одном варианте осуществления этап быстрой второй экспансии разделен на множество этапов для достижения вертикального масштабирования культивирования посредством: (a) проведения быстрой второй экспансии путем культивирования первой популяции Т-клеток в мелкомасштабной культуре в первом контейнере, например, контейнере G-REX 100MCS, в течение приблизительно от 3 до 4 дней, а затем (b) осуществления переноса первой популяции Т-клеток из мелкомасштабной культуры во второй контейнер, большего размера, чем первый контейнер, например, контейнер G-REX 500MCS, и культивирование первой популяции Т-клеток из мелкомасштабной культуры в более крупномасштабной культуре во втором контейнере в течение приблизительно от 4 до 7 дней. В еще одном варианте осуществления этап быстрой экспансии разделен на множество этапов для достижения горизонтального масштабирования культивирования посредством: (a) проведения быстрой второй экспансии путем культивирования первой популяции Т-клеток в первой мелкомасштабной культуре в первом контейнере, например, контейнере G-REX 100MCS, в течение приблизительно от 3 до 4 дней, а затем (b) осуществления переноса и распределения первой популяции Т-клеток из первой мелкомасштабной культуры в и среди по меньшей мере 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 вторых контейнеров, которые равны по размеру первому контейнеру, где в каждом из вторых контейнеров часть первой популяции Т-клеток из первой мелкомасштабной культуры, перенесенную в такой второй контейнер, культивируют во второй мелкомасштабной культуре в течение приблизительно от 4 до 7 дней. В еще одном варианте осуществления этап быстрой экспансии разделен на множество этапов для достижения горизонтального и вертикального масштабирования культивирования посредством: (a) проведения быстрой второй экспансии путем

культивирования первой популяции Т-клеток в мелкомасштабной культуре в первом контейнере, например, контейнере G-REX 100MCS, в течение приблизительно от 3 до 4 дней, а затем (b) осуществления переноса и распределения первой популяции Т-клеток из мелкомасштабной культуры в и среди по меньшей мере 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, контейнеров G-REX 500MCS, где в каждом из вторых контейнеров часть первой популяции Т-клеток из мелкомасштабной культуры, перенесенную в такой второй контейнер, культивируют в более крупномасштабной культуре в течение приблизительно от 4 до 7 дней. В еще одном варианте осуществления этап быстрой экспансии разделен на множество этапов для достижения горизонтального и вертикального масштабирования культивирования посредством: (a) проведения быстрой второй экспансии путем культивирования первой популяции Т-клеток в мелкомасштабной культуре в первом контейнере, например, контейнере G-REX 100MCS, в течение приблизительно 4 дней, а затем (b) осуществления переноса и распределения первой популяции Т-клеток из мелкомасштабной культуры в и среди по меньшей мере 2, 3 или 4 вторых контейнеров, большего размера, чем первый контейнер, например, контейнеров G-REX 500MCS, где в каждом из вторых контейнеров часть первой популяции Т-клеток из мелкомасштабной культуры, перенесенную в такой второй контейнер, культивируют в более крупномасштабной культуре в течение приблизительно 5 дней.

[001337] В еще одном варианте осуществления изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих абзацев, как применимо выше, модифицированный таким образом, что этап быстрой второй экспансии разделен на множество этапов для достижения вертикального масштабирования культивирования посредством: (a) проведения быстрой второй экспансии путем культивирования первой популяции Т-клеток в мелкомасштабной культуре в первом контейнере, например, контейнере G-REX 100MCS, в течение приблизительно от 2 до 4 дней, а затем (b) осуществления переноса первой популяции Т-клеток из мелкомасштабной культуры во второй контейнер, большего размера, чем первый контейнер, например, контейнер G-REX 500MCS, и культивирование первой популяции Т-клеток из мелкомасштабной культуры в более крупномасштабной культуре во втором контейнере в течение приблизительно от 5 до 7 дней.

[001338] В еще одном варианте осуществления изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих абзацев, как применимо выше, модифицированный таким образом, что этап быстрой экспансии разделен на множество этапов для достижения горизонтального масштабирования культивирования посредством: (a) проведения быстрой второй экспансии путем культивирования первой популяции Т-клеток в первой мелкомасштабной культуре в первом контейнере, например, контейнере G-REX 100MCS, в течение приблизительно от 2 до 4 дней, а затем (b) осуществления переноса и распределения первой популяции Т-клеток из первой мелкомасштабной культуры в и среди по меньшей мере 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 вторых контейнеров, которые равны по размеру первому контейнеру, где в каждом из вторых

контейнеров часть первой популяции Т-клеток из первой мелкомасштабной культуры, перенесенную в такой второй контейнер, культивируют во второй мелкомасштабной культуре в течение приблизительно от 5 до 7 дней.

[001339] В еще одном варианте осуществления изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих абзацев, как применимо выше, модифицированный таким образом, что этап быстрой экспансии разделен на множество этапов для достижения горизонтального и вертикального масштабирования культивирования посредством: (a) проведения быстрой второй экспансии путем культивирования первой популяции Т-клеток в мелкомасштабной культуре в первом контейнере, например, контейнере G-REX 100MCS, в течение приблизительно от 2 до 4 дней, а затем (b) осуществления переноса и распределения первой популяции Т-клеток из мелкомасштабной культуры в и среди по меньшей мере 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, контейнеров G-REX 500MCS, где в каждом из вторых контейнеров часть первой популяции Т-клеток из мелкомасштабной культуры, перенесенную в такой второй контейнер, культивируют в более крупномасштабной культуре в течение приблизительно от 5 до 7 дней.

[001340] В еще одном варианте осуществления изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих абзацев, как применимо выше, модифицированный таким образом, что этап быстрой экспансии разделен на множество этапов для достижения горизонтального и вертикального масштабирования культивирования посредством: (a) проведения быстрой второй экспансии путем культивирования первой популяции Т-клеток в мелкомасштабной культуре в первом контейнере, например, контейнере G-REX 100MCS, в течение приблизительно от 3 до 4 дней, а затем (b) осуществления переноса и распределения первой популяции Т-клеток из мелкомасштабной культуры в и среди 2, 3 или 4 вторых контейнеров, большего размера, чем первый контейнер, например, контейнеров G-REX 500MCS, где в каждом из вторых контейнеров часть первой популяции Т-клеток из мелкомасштабной культуры, перенесенную в такой второй контейнер, культивируют в более крупномасштабной культуре в течение приблизительно от 5 до 6 дней.

[001341] В еще одном варианте осуществления изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих абзацев, как применимо выше, модифицированный таким образом, что этап быстрой экспансии разделен на множество этапов для достижения горизонтального и вертикального масштабирования культивирования посредством: (a) проведения быстрой второй экспансии путем культивирования первой популяции Т-клеток в мелкомасштабной культуре в первом контейнере, например, контейнере G-REX 100MCS, в течение приблизительно от 3 до 4 дней, а затем (b) осуществления переноса и распределения первой популяции Т-клеток из мелкомасштабной культуры в и среди 2, 3 или 4 вторых контейнеров, большего размера, чем первый контейнер, например, контейнеров G-REX 500MCS, где в каждом из вторых контейнеров часть первой популяции Т-клеток из мелкомасштабной культуры, перенесенную в такой второй контейнер,

культивируют в более крупномасштабной культуре в течение приблизительно 5 дней.

[001342] В еще одном варианте осуществления изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих абзацев, как применимо выше, модифицированный таким образом, что этап быстрой экспансии разделен на множество этапов для достижения горизонтального и вертикального масштабирования культивирования посредством: (a) проведения быстрой второй экспансии путем культивирования первой популяции Т-клеток в мелкомасштабной культуре в первом контейнере, например, контейнере G-REX 100MCS, в течение приблизительно от 3 до 4 дней, а затем (b) осуществления переноса и распределения первой популяции Т-клеток из мелкомасштабной культуры в и среди 2, 3 или 4 вторых контейнеров, большего размера, чем первый контейнер, например, контейнеров G-REX 500MCS, где в каждом из вторых контейнеров часть первой популяции Т-клеток из мелкомасштабной культуры, перенесенную в такой второй контейнер, культивируют в более крупномасштабной культуре в течение приблизительно 6 дней.

[001343] В еще одном варианте осуществления изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих абзацев, как применимо выше, модифицированный таким образом, что этап быстрой экспансии разделен на множество этапов для достижения горизонтального и вертикального масштабирования культивирования посредством: (a) проведения быстрой второй экспансии путем культивирования первой популяции Т-клеток в мелкомасштабной культуре в первом контейнере, например, контейнере G-REX 100MCS, в течение приблизительно от 3 до 4 дней, а затем (b) осуществления переноса и распределения первой популяции Т-клеток из мелкомасштабной культуры в и среди 2, 3 или 4 вторых контейнеров, большего размера, чем первый контейнер, например, контейнеров G-REX 500MCS, где в каждом из вторых контейнеров часть первой популяции Т-клеток из мелкомасштабной культуры, перенесенную в такой второй контейнер, культивируют в более крупномасштабной культуре в течение приблизительно 7 дней.

[001344] В еще одном варианте осуществления изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих абзацев, как применимо выше, модифицированный таким образом, что примирующую первую экспансию на этапе (a) проводят в течение вплоть до 7 дней.

[001345] В еще одном варианте осуществления изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих абзацев, как применимо выше, модифицированный таким образом, что быструю вторую экспансию на этапе (b) проводят в течение вплоть до 8 дней.

[001346] В еще одном варианте осуществления изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих абзацев, как применимо выше, модифицированный таким образом, что быструю вторую экспансию на этапе (b) проводят в течение вплоть до 9 дней.

[001347] В еще одном варианте осуществления изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих абзацев, как применимо выше, модифицированный таким образом, что быструю вторую экспансию на этапе (b) проводят в течение вплоть до

10 дней.

[001348] В еще одном варианте осуществления изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих абзацев, как применимо выше, модифицированный таким образом, что быструю вторую экспансию на этапе (b) проводят в течение вплоть до 11 дней.

[001349] В еще одном варианте осуществления изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих абзацев, как применимо выше, модифицированный таким образом, что примирующую первую экспансию на этапе (a) проводят в течение 7 дней, а быструю вторую экспансию на этапе (b) проводят в течение вплоть до 9 дней.

[001350] В еще одном варианте осуществления изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих абзацев, как применимо выше, модифицированный таким образом, что примирующую первую экспансию на этапе (a) проводят в течение 7 дней, а быструю вторую экспансию на этапе (b) проводят в течение вплоть до 10 дней.

[001351] В еще одном варианте осуществления изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих абзацев, как применимо выше, модифицированный таким образом, что примирующую первую экспансию на этапе (a) проводят в течение 7 дней или 8 дней, а быструю вторую экспансию на этапе (b) проводят в течение вплоть до 9 дней.

[001352] В еще одном варианте осуществления изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих абзацев, как применимо выше, модифицированный таким образом, что примирующую первую экспансию на этапе (a) проводят в течение 7 дней или 8 дней, а быструю вторую экспансию на этапе (b) проводят в течение вплоть до 10 дней.

[001353] В еще одном варианте осуществления изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих абзацев, как применимо выше, модифицированный таким образом, что примирующую первую экспансию на этапе (a) проводят в течение 8 дней, а быструю вторую экспансию на этапе (b) проводят в течение вплоть до 9 дней.

[001354] В еще одном варианте осуществления изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих абзацев, как применимо выше, модифицированный таким образом, что примирующую первую экспансию на этапе (a) проводят в течение 8 дней, и быструю вторую экспансию на этапе (b) проводят в течение вплоть до 8 дней.

[001355] В еще одном варианте осуществления изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих абзацев, как применимо выше, модифицированный таким образом, что на этапе (a) первую популяцию Т-клеток культивируют в первой культуральной среде, содержащей OKT-3 и IL-2.

[001356] В еще одном варианте осуществления изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих абзацев, как применимо выше, модифицированный таким образом, что первая культуральная среда содержит агонист 4-1BB, OKT-3 и IL-2.

[001357] В еще одном варианте осуществления изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих абзацев, как применимо выше, модифицированный

таким образом, что первая культуральная среда содержит OKT-3, IL-2 и антигенпрезентирующие клетки (АПК).

[001358] В еще одном варианте осуществления изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих абзацев, как применимо выше, модифицированный таким образом, что первая культуральная среда содержит агонист 4-1BB, OKT-3, IL-2 и антигенпрезентирующие клетки (АПК).

[001359] В еще одном варианте осуществления изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих абзацев, как применимо выше, модифицированный таким образом, что на этапе (a) первую популяцию Т-клеток культивируют в первой культуральной среде в контейнере, содержащем первую газопроницаемую поверхность, где первая культуральная среда содержит OKT-3, IL-2 и первую популяцию антигенпрезентирующих клеток (АПК), где первая популяция АПК является экзогенной по отношению к донору первой популяции Т-клеток, и первую популяцию АПК наслаивают на первую газопроницаемую поверхность, где на этапе (b) первую популяцию Т-клеток культивируют во второй культуральной среде в контейнере, где вторая культуральная среда содержит OKT-3, IL-2 и вторую популяцию АПК, где вторая популяция АПК является экзогенной по отношению к донору первой популяции Т-клеток, и вторую популяцию АПК наслаивают на первую газопроницаемую поверхность, и где вторая популяция АПК больше, чем первая популяция АПК.

[001360] В еще одном варианте осуществления изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих абзацев, как применимо выше, модифицированный таким образом, что на этапе (a) первую популяцию Т-клеток культивируют в первой культуральной среде в контейнере, содержащем первую газопроницаемую поверхность, где первая культуральная среда содержит агонист 4-1BB, OKT-3, IL-2 и первую популяцию антигенпрезентирующих клеток (АПК), где первая популяция АПК является экзогенной по отношению к донору первой популяции Т-клеток, и первую популяцию АПК наслаивают на первую газопроницаемую поверхность, где на этапе (b) первую популяцию Т-клеток культивируют во второй культуральной среде в контейнере, где вторая культуральная среда содержит OKT-3, IL-2 и вторую популяцию АПК, где вторая популяция АПК является экзогенной по отношению к донору первой популяции Т-клеток, и вторую популяцию АПК наслаивают на первую газопроницаемую поверхность, и где вторая популяция АПК больше, чем первая популяция АПК.

[001361] В еще одном варианте осуществления изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих абзацев, как применимо выше, модифицированный таким образом, что на этапе (a) первую популяцию Т-клеток культивируют в первой культуральной среде в контейнере, содержащем первую газопроницаемую поверхность, где первая культуральная среда содержит OKT-3, IL-2 и первую популяцию антигенпрезентирующих клеток (АПК), где первая популяция АПК является экзогенной по отношению к донору первой популяции Т-клеток, и первую популяцию АПК наслаивают на первую газопроницаемую поверхность, где на этапе (b) первую популяцию Т-клеток

культивируют во второй культуральной среде в контейнере, где вторая культуральная среда содержит агонист 4-1BB, OKT-3, IL-2 и вторую популяцию АПК, где вторая популяция АПК является экзогенной по отношению к донору первой популяции Т-клеток, и вторую популяцию АПК наслаивают на первую газопроницаемую поверхность, и где вторая популяция АПК больше, чем первая популяция АПК.

[001362] В еще одном варианте осуществления изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих абзацев, как применимо выше, модифицированный таким образом, что на этапе (a) первую популяцию Т-клеток культивируют в первой культуральной среде в контейнере, содержащем первую газопроницаемую поверхность, где первая культуральная среда содержит агонист 4-1BB, OKT-3, IL-2 и первую популяцию антигенпрезентирующих клеток (АПК), где первая популяция АПК является экзогенной по отношению к донору первой популяции Т-клеток, и первую популяцию АПК наслаивают на первую газопроницаемую поверхность, где на этапе (b) первую популяцию Т-клеток культивируют во второй культуральной среде в контейнере, где вторая культуральная среда содержит агонист 4-1BB, OKT-3, IL-2 и вторую популяцию АПК, где вторая популяция АПК является экзогенной по отношению к донору первой популяции Т-клеток, и вторую популяцию АПК наслаивают на первую газопроницаемую поверхность, и где вторая популяция АПК больше, чем первая популяция АПК.

[001363] В еще одном варианте осуществления изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих абзацев, как применимо выше, модифицированный таким образом, что соотношение количества АПК во второй популяции АПК и количества АПК в первой популяции АПК составляет приблизительно 2:1.

[001364] В еще одном варианте осуществления изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих абзацев, как применимо выше, модифицированный таким образом, что количество АПК в первой популяции АПК составляет приблизительно $2{,}5\times10^8$, а количество АПК во второй популяции АПК составляет приблизительно 5×10^8.

[001365] В еще одном варианте осуществления изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих абзацев, как применимо выше, модифицированный таким образом, что на этапе (a) первую популяцию АПК наслаивают на первую газопроницаемую поверхность со средней толщиной, составляющей 2 слоя АПК.

[001366] В еще одном варианте осуществления изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих абзацев, как применимо выше, модифицированный таким образом, что на этапе (b) вторую популяцию АПК наслаивают на первую газопроницаемую поверхность со средней толщиной, выбранной из диапазона от 4 до 8 слоев АПК.

[001367] В еще одном варианте осуществления изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих абзацев, как применимо выше, модифицированный таким образом, что отношение среднего количества слоев АПК, наслоенных на первую газопроницаемую поверхность на этапе (b), к среднему количеству слоев АПК, наслоенных на первую газопроницаемую поверхность на этапе (a), составляет 2:1.

[001368] В еще одном варианте осуществления изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих абзацев, как применимо выше, модифицированный таким образом, что на этапе (a) первую популяцию АПК высевают на первую газопроницаемую поверхность с плотностью, выбранной из диапазона от или приблизительно от $1,0\times10^6$ АПК/см^2 до или приблизительно до $4,5\times10^6$ АПК/см^2.

[001369] В еще одном варианте осуществления изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих абзацев, как применимо выше, модифицированный таким образом, что на этапе (a) первую популяцию АПК высевают на первую газопроницаемую поверхность с плотностью, выбранной из диапазона от или приблизительно от $1,5\times10^6$ АПК/см^2 до или приблизительно до $3,5\times10^6$ АПК/см^2.

[001370] В еще одном варианте осуществления изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих абзацев, как применимо выше, модифицированный таким образом, что на этапе (a) первую популяцию АПК высевают на первую газопроницаемую поверхность с плотностью, выбранной из диапазона от или приблизительно от $2,0\times10^6$ АПК/см^2 до или приблизительно до $3,0\times10^6$ АПК/см^2.

[001371] В еще одном варианте осуществления изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих абзацев, как применимо выше, модифицированный таким образом, что на этапе (a) первую популяцию АПК высевают на первую газопроницаемую поверхность с плотностью, составляющей или приблизительно составляющей 2.0×10^6 АПК/см^2.

[001372] В еще одном варианте осуществления изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих абзацев, как применимо выше, модифицированный таким образом, что на этапе (b) вторую популяцию АПК высевают на первую газопроницаемую поверхность с плотностью, выбранной из диапазона от или приблизительно от $2,5\times10^6$ АПК/см^2 до или приблизительно до $7,5\times10^6$ АПК/см^2.

[001373] В еще одном варианте осуществления изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих абзацев, как применимо выше, модифицированный таким образом, что на этапе (b) вторую популяцию АПК высевают на первую газопроницаемую поверхность с плотностью, выбранной из диапазона от или приблизительно от $3,5\times10^6$ АПК/см^2 до или приблизительно до $6,0\times10^6$ АПК/см^2.

[001374] В еще одном варианте осуществления изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих абзацев, как применимо выше, модифицированный таким образом, что на этапе (b) вторую популяцию АПК высевают на первую газопроницаемую поверхность с плотностью, выбранной из диапазона от или приблизительно от $4,0\times10^6$ АПК/см^2 до или приблизительно до $5,5\times10^6$ АПК/см^2.

[001375] В еще одном варианте осуществления изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих абзацев, как применимо выше, модифицированный таким образом, что на этапе (b) вторую популяцию АПК высевают на первую газопроницаемую поверхность с плотностью, составляющей или приблизительно составляющей $4,0\times10^6$ АПК/см^2.

[001376] В еще одном варианте осуществления изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих абзацев, как применимо выше, модифицированный таким образом, что на этапе (a) первую популяцию АПК высевают на первую газопроницаемую поверхность с плотностью, выбранной из диапазона от или приблизительно от $1,0\times10^6$ АПК/см^2 до или приблизительно до $4,5\times10^6$ АПК/см^2, и на этапе (b) вторую популяцию АПК высевают на первую газопроницаемую поверхность с плотностью, выбранной из диапазона от или приблизительно от $2,5\times10^6$ АПК/см^2 до или приблизительно до $7,5\times10^6$ АПК/см^2.

[001377] В еще одном варианте осуществления изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих абзацев, как применимо, модифицированный таким образом, что на этапе (a) первую популяцию АПК высевают на первую газопроницаемую поверхность с плотностью, выбранной из диапазона от или приблизительно от $1,5\times10^6$ АПК/см^2 до или приблизительно до $3,5\times10^6$ АПК/см^2, и на этапе (b) вторую популяцию АПК высевают на первую газопроницаемую поверхность с плотностью, выбранной из диапазона от или приблизительно от $3,5\times10^6$ АПК/см^2 до или приблизительно до $6,0\times10^6$ АПК/см^2.

[001378] В еще одном варианте осуществления изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих абзацев, как применимо выше, модифицированный таким образом, что на этапе (a) первую популяцию АПК высевают на первую газопроницаемую поверхность с плотностью, выбранной из диапазона от или приблизительно от $2,0\times10^6$ АПК/см^2 до или приблизительно до $3,0\times10^6$ АПК/см^2, и на этапе (b) вторую популяцию АПК высевают на первую газопроницаемую поверхность с плотностью, выбранной из диапазона от или приблизительно от $4,0\times10^6$ АПК/см^2 до или приблизительно до $5,5\times10^6$ АПК/см^2.

[001379] В еще одном варианте осуществления изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих абзацев, как применимо выше, модифицированный таким образом, что на этапе (a) первую популяцию АПК высевают на первую газопроницаемую поверхность с плотностью, составляющей или приблизительно составляющей $2,0\times10^6$ АПК/см^2, и на этапе (b) вторую популяцию АПК высевают на первую газопроницаемую поверхность с плотностью, составляющей или приблизительно составляющей $4,0\times10^6$ АПК/см^2.

[001380] В еще одном варианте осуществления изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих абзацев, как применимо выше, модифицированный таким образом, что АПК представляют собой мононуклеарные клетки периферической крови (МНПК).

[001381] В еще одном варианте осуществления изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих абзацев, как применимо выше, модифицированный таким образом, что МНПК являются облученными и экзогенными для донора первой популяции Т-клеток.

[001382] В еще одном варианте осуществления изобретения предложен способ,

описанный в любом из предыдущих абзацев, как применимо выше, модифицированный таким образом, что Т-клетки представляют собой опухоль-инфильтрирующие лимфоциты (TIL).

[001383] В еще одном варианте осуществления изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих абзацев, как применимо выше, модифицированный таким образом, что Т-клетки представляют собой лимфоциты, инфильтрирующие костный мозг (MIL).

[001384] В еще одном варианте осуществления изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих абзацев, как применимо выше, модифицированный таким образом, что Т-клетки представляют собой лимфоциты периферической крови (PBL).

[001385] В еще одном варианте осуществления изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих абзацев, как применимо выше, модифицированный таким образом, что первую популяцию Т-клеток получают отделением от цельной крови донора.

[001386] В еще одном варианте осуществления изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих абзацев, как применимо выше, модифицированный таким образом, что первую популяцию Т-клеток получают отделением от продукта афереза донора.

[001387] В еще одном варианте осуществления изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих абзацев, как применимо выше, модифицированный таким образом, что первую популяцию Т-клеток отделяют от цельной крови или продукта афереза донора путем положительного или отрицательного отбора по фенотипу Т-клеток.

[001388] В еще одном варианте осуществления изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих абзацев, как применимо выше, модифицированный таким образом, что фенотип Т-клеток представляет собой CD3+ и CD45+.

[001389] В еще одном варианте осуществления изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих абзацев, как применимо выше, модифицированный таким образом, что перед проведением примирующей первой экспансии первой популяции Т-клеток Т-клетки отделяют от NK-клеток. В еще одном варианте осуществления Т-клетки отделяют от NK-клеток в первой популяции Т-клеток путем удаления CD3- CD56+ клеток из первой популяции Т-клеток. В еще одном варианте осуществления CD3- CD56+ клетки удаляют из первой популяции Т-клеток, подвергая первую популяцию Т-клеток сортировке клеток с использованием стратегии гейтирования, которая удаляет фракцию CD3- CD56+ клеток и выделяет отрицательную фракцию. В еще одном варианте осуществления вышеупомянутый способ используют для экспансии Т-клеток в первой популяции Т-клеток, характеризующейся высоким процентом NK-клеток. В еще одном варианте осуществления вышеупомянутый способ используют для экспансии Т-клеток в первой популяции Т-клеток, характеризующейся высоким процентом CD3- CD56+ клеток. В еще одном варианте осуществления вышеупомянутый способ используют для экспансии Т-клеток в опухолевой ткани, характеризующейся наличием большого количества NK-

клеток. В еще одном варианте осуществления вышеупомянутый способ используют для экспансии Т-клеток в опухолевой ткани, характеризующейся большим количеством CD3- CD56+ клеток. В еще одном варианте осуществления вышеупомянутый способ используют для экспансии Т-клеток в опухолевой ткани, полученной от пациента, страдающего опухолью, характеризующейся наличием большого количества NK-клеток. В еще одном варианте осуществления вышеупомянутый способ используют для экспансии Т-клеток в опухолевой ткани, полученной от пациента, страдающего опухолью, характеризующейся наличием большого количества CD3- CD56+ клеток. В еще одном варианте осуществления вышеупомянутый способ используют для экспансии Т-клеток в опухолевой ткани, полученной от пациента, страдающего раком яичника.

[001390] В еще одном варианте осуществления изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих абзацев, как применимо выше, модифицированный таким образом, что количество Т-клеток, составляющее или приблизительно составляющее 1×10^7, высевают в контейнер, чтобы начать примирующую первую экспансию культуры в таком контейнере.

[001391] В еще одном варианте осуществления изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих абзацев, как применимо выше, модифицированный таким образом, что первую популяцию Т-клеток распределяют во множество контейнеров, и в каждый контейнер высевают количество Т-клеток, составляющее или приблизительно составляющее 1×10^7, чтобы начать примирующую первую экспансию культуры в таком контейнере.

[001392] В еще одном варианте осуществления изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих абзацев, как применимо выше, модифицированный таким образом, что вторая популяция TIL, собранная на этапе (c), представляет собой терапевтическую популяцию TIL.

Фармацевтические композиции, дозировки и режимы дозирования

[001393] В одном из вариантов осуществления TIL, подвергнутые экспансии с использованием способов согласно настоящему изобретению, вводят пациенту в виде фармацевтической композиции. В одном из вариантов осуществления фармацевтическая композиция представляет собой суспензию TIL в стерильном буфере. TIL, подвергнутые экспансии с использованием МНПК согласно настоящему изобретению, могут быть введены любым подходящим способом, известным в данной области техники. В некоторых вариантах осуществления Т-клетки вводят в виде однократной внутриартериальной или внутривенной инфузии, которая предпочтительно длится примерно от 30 до 60 минут. Другие подходящие способы введения включают внутрибрюшинное, интратекальное и внутрилимфатическое введение.

[001394] Может быть введена любая подходящая доза TIL. В некоторых вариантах осуществления вводят от приблизительно $2,3\times10^{10}$ до приблизительно $13,7\times10^{10}$ TIL, в среднем около $7,8\times10^{10}$ TIL, в частности, если рак представляет собой меланому. В одном из вариантов осуществления вводят от приблизительно $1,2\times10^{10}$ до приблизительно $4,3\times10^{10}$

TIL. В некоторых вариантах осуществления вводят от приблизительно 3×10^{10} до приблизительно 12×10^{10} TIL. В некоторых вариантах осуществления вводят от приблизительно 4×10^{10} до приблизительно 10×10^{10} TIL. В некоторых вариантах осуществления вводят от приблизительно 5×10^{10} до приблизительно 8×10^{10} TIL. В некоторых вариантах осуществления вводят от приблизительно 6×10^{10} до приблизительно 8×10^{10} TIL. В некоторых вариантах осуществления вводят от приблизительно 7×10^{10} до приблизительно 8×10^{10} TIL. В некоторых вариантах осуществления терапевтически эффективная дозировка составляет от приблизительно $2{,}3\times10^{10}$ до приблизительно $13{,}7\times10^{10}$. В некоторых вариантах осуществления терапевтически эффективная дозировка составляет приблизительно $7{,}8\times10^{10}$, в особенности когда рак представляет собой меланому. В некоторых вариантах осуществления терапевтически эффективная дозировка составляет от приблизительно $1{,}2\times10^{10}$ до приблизительно $4{,}3\times10^{10}$ TIL. В некоторых вариантах осуществления терапевтически эффективная дозировка составляет от приблизительно 3×10^{10} до приблизительно 12×10^{10} TIL. В некоторых вариантах осуществления терапевтически эффективная дозировка составляет от приблизительно 4×10^{10} до приблизительно 10×10^{10} TIL. В некоторых вариантах осуществления терапевтически эффективная дозировка составляет от приблизительно 5×10^{10} до приблизительно 8×10^{10} TIL. В некоторых вариантах осуществления терапевтически эффективная дозировка составляет от приблизительно 6×10^{10} до приблизительно 8×10^{10} TIL. В некоторых вариантах осуществления терапевтически эффективная дозировка составляет от приблизительно 7×10^{10} до приблизительно 8×10^{10} TIL.

[001395] В некоторых вариантах осуществления количество TIL, содержащееся в фармацевтических композициях согласно изобретению, составляет приблизительно 1×10^{6}, 2×10^{6}, 3×10^{6}, 4×10^{6}, 5×10^{6}, 6×10^{6}, 7×10^{6}, 8×10^{6}, 9×10^{6}, 1×10^{7}, 2×10^{7}, 3×10^{7}, 4×10^{7}, 5×10^{7}, 6×10^{7}, 7×10^{7}, 8×10^{7}, 9×10^{7}, 1×10^{8}, 2×10^{8}, 3×10^{8}, 4×10^{8}, 5×10^{8}, 6×10^{8}, 7×10^{8}, 8×10^{8}, 9×10^{8}, 1×10^{9}, 2×10^{9}, 3×10^{9}, 4×10^{9}, 5×10^{9}, 6×10^{9}, 7×10^{9}, 8×10^{9}, 9×10^{9}, 1×10^{10}, 2×10^{10}, 3×10^{10}, 4×10^{10}, 5×10^{10}, 6×10^{10}, 7×10^{10}, 8×10^{10}, 9×10^{10}, 1×10^{11}, 2×10^{11}, 3×10^{11}, 4×10^{11}, 5×10^{11}, 6×10^{11}, 7×10^{11}, 8×10^{11}, 9×10^{11}, 1×10^{12}, 2×10^{12}, 3×10^{12}, 4×10^{12}, 5×10^{12}, 6×10^{12}, 7×10^{12}, 8×10^{12}, 9×10^{12}, 1×10^{13}, 2×10^{13}, 3×10^{13}, 4×10^{13}, 5×10^{13}, 6×10^{13}, 7×10^{13}, 8×10^{13} и 9×10^{13}. В одном из вариантов осуществления количество TIL, содержащееся в фармацевтических композициях согласно изобретению, составляет 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}.

[001396] В некоторых вариантах осуществления концентрация TIL в фармацевтических композициях согласно изобретению составляет менее, например, 100%, 90%, 80%, 70%, 60%, 50%, 40%, 30%, 20%, 19%, 18%, 17%, 16%, 15%, 14%, 13%, 12%, 11%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0,5%, 0,4%, 0,3%, 0,2%, 0,1%, 0,09%, 0,08%, 0,07%, 0,06%, 0,05%, 0,04%, 0,03%, 0,02%, 0,01%, 0,009%, 0,008%, 0,007%, 0,006%, 0,005%, 0,004%, 0,003%, 0,002%, 0,001%, 0,0009%, 0,0008%, 0,0007%, 0,0006%, 0,0005%, 0,0004%,

0,0003%, 0,0002% или 0,0001%, мас./мас., мас./об. или об./об., фармацевтической композиции.

[001397] В некоторых вариантах осуществления концентрация TIL в фармацевтических композициях согласно изобретению составляет более 90%, 80%, 70%, 60%, 50%, 40%, 30%, 20%, 19,75%, 19,50%, 19,25% 19%, 18,75%, 18,50%, 18,25% 18%, 17,75%, 17,50%, 17,25% 17%, 16,75%, 16,50%, 16,25% 16%, 15,75%, 15,50%, 15,25% 15%, 14,75%, 14,50%, 14,25% 14%, 13,75%, 13,50%, 13,25% 13%, 12,75%, 12,50%, 12,25% 12%, 11,75%, 11,50%, 11,25% 11%, 10,75%, 10,50%, 10,25% 10%, 9,75%, 9,50%, 9,25% 9%, 8,75%, 8,50%, 8,25% 8%, 7,75%, 7,50%, 7,25% 7%, 6,75%, 6,50%, 6,25% 6%, 5,75%, 5,50%, 5,25% 5%, 4,75%, 4,50%, 4,25%, 4%, 3,75%, 3,50%, 3,25%, 3%, 2,75%, 2,50%, 2,25%, 2%, 1,75%, 1,50%, 125%, 1%, 0,5%, 0,4%, 0,3%, 0,2%, 0,1%, 0,09%, 0,08%, 0,07%, 0,06%, 0,05%, 0,04%, 0,03%, 0,02%, 0,01%, 0,009%, 0,008%, 0,007%, 0,006%, 0,005%, 0,004%, 0,003%, 0,002%, 0,001%, 0,0009%, 0,0008%, 0,0007%, 0,0006%, 0,0005%, 0,0004%, 0,0003%, 0,0002% или 0,0001%, мас./мас., мас./об. или об./об., фармацевтической композиции.

[001398] В некоторых вариантах осуществления концентрация TIL в фармацевтических композициях согласно изобретению составляет 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 от приблизительно 1% до приблизительно 10%, мас./мас., мас./об. или об./об., фармацевтической композиции.

[001399] В некоторых вариантах осуществления концентрация TIL в фармацевтических композициях согласно изобретению составляет 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%, мас./мас., мас./об. или об./об., фармацевтической композиции.

[001400] В некоторых вариантах осуществления количество TIL, содержащееся в

фармацевтических композициях согласно изобретению, равно или меньше 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.

[001401] В некоторых вариантах осуществления количество TIL, содержащееся в фармацевтических композициях согласно 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.

[001402] TIL, содержащиеся в фармацевтических композициях согласно изобретению, эффективны в широком диапазоне дозировок. Точная дозировка будет зависеть от способа введения, формы, в которой вводят соединение, пола и возраста субъекта, подлежащего лечению, массы тела субъекта, подлежащего лечению, а также предпочтений и опыта лечащего врача. При необходимости также можно применять клинически установленные дозировки TIL. Количества фармацевтических композиций, вводимые с использованием описанных в настоящем документе способов, такие как дозировки TIL, будут зависеть от человека или млекопитающего, подвергаемого лечению, тяжести расстройства или состояния, скорости введения, распределения активных фармацевтических ингредиентов и мнения лечащего врача.

[001403] В некоторых вариантах осуществления TIL могут быть введены посредством однократной дозы. Такое введение может осуществляться путем инъекции, например, внутривенной инъекции. В некоторых вариантах осуществления TIL могут быть введены посредством многократных доз. Введение доз может осуществляться один раз, два раза, три раза, четыре раза, пять раз, шесть раз или более шести раз в год. Введение доз может осуществляться один раз в месяц, один раз в две недели, один раз в неделю или один раз в два дня. Введение TIL может продолжаться столько, сколько необходимо.

[001404] В некоторых вариантах осуществления 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}. В некоторых вариантах осуществления эффективная дозировка TIL составляет 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}.

[001405] В некоторых вариантах осуществления эффективная дозировка TIL составляет 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 mg 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 mg 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.

[001406] В некоторых вариантах осуществления эффективная дозировка TIL составляет 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, or 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.

[001407] Эффективное количество TIL может быть введено либо посредством

однократной, либо посредством многократных доз любым из принятых способов введения агентов, имеющих схожее назначение, включая интраназальный и трансдермальный способы, путем внутриартериальной инъекции, внутривенно, внутрибрюшинно, парентерально, внутримышечно, подкожно, местно, путем трансплантации или путем ингаляции.

[001408] В еще одном варианте осуществления изобретения предложен пакет для инфузии, содержащий терапевтическую популяцию TIL, описанную в любом из предыдущих абзацев, как применимо выше.

[001409] В еще одном варианте осуществления изобретения предложена композиция опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов (TIL), содержащая терапевтическую популяцию TIL, описанную в любом из предыдущих абзацев, как применимо выше, и фармацевтически приемлемый носитель.

[001410] В еще одном варианте осуществления изобретения предложен пакет для инфузии, содержащий композицию TIL, описанную в любом из предыдущих абзацев, как применимо выше.

[001411] В еще одном варианте осуществления изобретения предложен криоконсервированный препарат терапевтической популяции TIL, описанной в любом из предыдущих абзацев, как применимо выше.

[001412] В еще одном варианте осуществления изобретения предложена композиция опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов (TIL), содержащая терапевтическую популяцию TIL, описанную в любом из предыдущих абзацев, как применимо выше, и среду для криоконсервации.

[001413] В еще одном варианте осуществления изобретения предложена композиция TIL, описанная в любом из предыдущих абзацев, как применимо выше, модифицированная таким образом, что среда для криоконсервации содержит ДМСО.

[001414] В еще одном варианте осуществления изобретения предложена композиция TIL, описанная в любом из предыдущих абзацев, как применимо выше, модифицированная таким образом, что среда для криоконсервации содержит 7-10% ДМСО.

[001415] В еще одном варианте осуществления изобретения предложен криоконсервированный препарат композиции TIL, описанной в любом из предыдущих абзацев, как применимо.

Способы лечения пациентов

[001416] Способы лечения начинают с первоначального сбора TIL и культивирования TIL. Способы осуществления обоих процессов описаны в данной области техники, например, в источнике Jin *et al., J. Immunotherapy*, **2012**, 35(3):283-292, включенном в настоящий документ посредством ссылки в полном объеме. Варианты осуществления способов лечения описаны в следующих разделах, включая раздел примеров.

[001417] Подвергнутые экспансии TIL, полученные в соответствии со способами, описанными в настоящем документе, в том числе, например, как описано на этапах с A по

F выше или в соответствии со этапами с A по F выше (также как показано, например, на фиг. 1 (в частности, например, фиг. 1B)), являются особенно подходящими для лечения пациентов, имеющих рак (например, как описано в источнике Goff, et al., *J. Clinical Oncology*, **2016**, 34(20):2389-239, а также в дополнительном материале; включены в настоящий документ посредством ссылки в полном объеме). В некоторых вариантах осуществления TIL выращивали из резецированного материала метастатической меланомы, как описано ранее (см. источник Dudley, et al., *J Immunother.*, **2003**, 26:332-342; включен в настоящий документ посредством ссылки в полном объеме). Свежая опухоль может быть подвергнута диссекции в стерильных условиях. Может быть взят репрезентативный образец для формального патоморфологического исследования. Можно применять отдельные фрагменты размером от 2 $мм^3$ до 3 $мм^3$. В некоторых вариантах осуществления берут 5, 10, 15, 20, 25 или 30 образцов на пациента. В некоторых вариантах осуществления берут 20, 25 или 30 образцов на пациента. В некоторых вариантах осуществления берут 20, 22, 24, 26 или 28 образцов на пациента. В некоторых вариантах осуществления берут 24 образца на пациента. Образцы могут быть помещены в отдельные лунки 24-луночного планшета, поддерживаться в среде для выращивания с высокой дозой IL-2 (6000 МЕ/мл) и контролироваться на предмет разрушения опухоли и/или пролиферации TIL. Любая опухоль с жизнеспособными клетками, оставшимися после обработки, может быть подвергнута ферментативному гидролизу с получением суспензии отдельных клеток и заморожена, как описано в настоящем документе.

[001418] В некоторых вариантах осуществления образец успешно выращенных TIL может быть взят для анализа фенотипа (CD3, CD4, CD8 и CD56) и протестирован против аутологичной опухоли, если таковая имеется. TIL можно считать реактивными, если совместное культивирование в течение ночи дало уровни интерферона гамма (IFN-γ) > 200 пг/мл и в два раза выше фона. (Goff, et al., *J Immunother.*, **2010**, 33:840-847; включен в настоящий документ посредством ссылки в полном объеме). В некоторых вариантах осуществления культуры с признаками аутологичной реактивности или достаточной динамики роста могут быть выбраны для второй экспансии (например, второй экспансии в соответствии с этапом D на фиг. 1 (в частности, например, фиг. 1B)), включая вторые экспансии, иногда называемые быстрой экспансией (REP). В некоторых вариантах осуществления подвергнутые экспансии TIL с высокой аутологичной реактивностью (например, высокой степенью пролиферации во время второй экспансии), выбирают для дополнительной второй экспансии. В некоторых вариантах осуществления TIL с высокой аутологичной реактивностью (например, высокой степенью пролиферации во время второй экспансии, как представлено на этапе D на фиг. 1 (в частности, например, фиг. 1B)), выбирают для дополнительной второй экспансии в соответствии с этапом D на фиг. 1 (в частности, например, фиг. 1B).

[001419] В некоторых вариантах осуществления пациента не переводят непосредственно на ACT (адоптивный перенос клеток), например, в некоторых вариантах осуществления после сбора опухоли и/или первой экспансии клетки не используются

немедленно. В некоторых вариантах осуществления TIL могут быть криоконсервированы и размороженны за 2 дня до введения пациенту. В некоторых вариантах осуществления TIL могут быть криоконсервированы и размороженны за 1 день до введения пациенту. В некоторых вариантах осуществления TIL могут быть криоконсервированы и размороженны непосредственно перед введением пациенту.

[001420] Клеточные фенотипы криоконсервированных образцов TIL из пакета для инфузии могут быть проанализированы с помощью проточной цитометрии (например, FlowJo) на предмет поверхностных маркеров CD3, CD4, CD8, CCR7 и CD45RA (BD BioSciences), а также любым из описанных в настоящем документе способов. Сывороточные цитокины измеряли с помощью стандартных методов твердофазного иммуноферментного анализа. Повышение уровня IFN-гамма в сыворотке было определено как >100 пг/мл и превышающее 4 3 исходных уровня.

[001421] В некоторых вариантах осуществления TIL, полученные способами, предложенными в настоящем документе, например, проиллюстрированными на фиг. 1 (в частности, например, фиг. 1B), обеспечивают неожиданное улучшение клинической эффективности TIL. В некоторых вариантах осуществления TIL, полученные способами, предложенными в настоящем документе, например, проиллюстрированными на фиг. 1 (в частности, например, фиг. 1B), демонстрируют повышенную клиническую эффективность по сравнению с TIL, полученными способами, отличными от описанных в настоящем документе, включая, например, способы, отличные от проиллюстрированных на фиг. 1 (в частности, например, фиг. 1B). В некоторых вариантах осуществления способы, отличные от описанных в настоящем документе, включают способы, называемые процессом 1C и/или поколением 1 (Gen 1). В некоторых вариантах осуществления повышенную эффективность измеряют с помощью ЧКЗ, ЧОО и/или других клинических ответов. В некоторых вариантах осуществления TIL, полученные способами, предложенными в настоящем документе, например, проиллюстрированными на фиг. 1 (в частности, например, фиг. 1B), демонстрируют аналогичное время до достижения ответа и профиль безопасности по сравнению с TIL, полученными способами, отличными от описанных в настоящем документе, включая, например, способы, отличные от проиллюстрированных на фиг. 1 (в частности, например, фиг. 1B), например, процесс Gen 1.

[001422] В некоторых вариантах осуществления IFN-гамма (IFN-γ) свидетельствует об эффективности лечения и/или повышенной клинической эффективности. В некоторых вариантах осуществления IFN-γ в крови субъектов, получающих TIL, свидетельствует о наличии активных TIL. В некоторых вариантах осуществления используют определение содержания действующего вещества по продукции IFN-γ. Продукция IFN-γ является еще одним показателем цитотоксического потенциала. Продукция IFN-γ может быть измерена путем определения уровней цитокина IFN-γ в крови, сыворотке или TIL *ex vivo* у субъекта, получающего TIL, полученные способами согласно настоящему изобретению, включая описанные, например, на фиг. 1 (в частности, например, фиг. 1B). В некоторых вариантах осуществления увеличение IFN-γ свидетельствует об эффективности лечения у пациента,

получающего TIL, полученные способами согласно настоящему изобретению. В некоторых вариантах осуществления IFN-γ увеличен в один, два, три, четыре или пять или более раз по сравнению с пациентом, не получавшим лечения, и/или по сравнению с пациентом, получавшим TIL, полученные с использованием способов, отличных от предложенных в настоящем документе, включая, например, способы, отличные от воплощенных на фиг. 1 (в частности, например, фиг. 1B). В некоторых вариантах осуществления секреция IFN-γ увеличена в один раз по сравнению с пациентом, не получавшим лечения, и/или по сравнению с пациентом, получавшим TIL, полученные с использованием способов, отличных от предложенных в настоящем документе, включая, например, способы, отличные от воплощенных на фиг. 1 (в частности, например, фиг. 1B). В некоторых вариантах осуществления секреция IFN-γ увеличена в два раза по сравнению с пациентом, не получавшим лечения, и/или по сравнению с пациентом, получавшим TIL, полученные с использованием способов, отличных от предложенных в настоящем документе, включая, например, способы, отличные от воплощенных на фиг. 1 (в частности, например, фиг. 1B). В некоторых вариантах осуществления секреция IFN-γ увеличена в три раза по сравнению с пациентом, не получавшим лечения, и/или по сравнению с пациентом, получавшим TIL, полученные с использованием способов, отличных от предложенных в настоящем документе, включая, например, способы, отличные от воплощенных на фиг. 1 (в частности, например, фиг. 1B). В некоторых вариантах осуществления секреция IFN-γ увеличена в четыре раза по сравнению с пациентом, не получавшим лечения, и/или по сравнению с пациентом, получавшим TIL, полученные с использованием способов, отличных от предложенных в настоящем документе, включая, например, способы, отличные от воплощенных на фиг. 1 (в частности, например, фиг. 1B). В некоторых вариантах осуществления секреция IFN-γ увеличена в пять раз по сравнению с пациентом, не получавшим лечения, и/или по сравнению с пациентом, получавшим TIL, полученные с использованием способов, отличных от предложенных в настоящем документе, включая, например, способы, отличные от воплощенных на фиг. 1 (в частности, например, фиг. 1B). В некоторых вариантах осуществления IFN-γ измеряют с использованием набора для ELISA от Quantikine. В некоторых вариантах осуществления IFN-γ измеряют в TIL *ex vivo* у субъекта, получающего TIL, полученные способами согласно настоящему изобретению, включая описанные, например, на фиг. 1 (в частности, например, фиг. 1B). В некоторых вариантах осуществления IFN-γ измеряют в крови субъекта, получающего TIL, полученные способами согласно настоящему изобретению, включая описанные, например, на фиг. 1 (в частности, например, фиг. 1B). В некоторых вариантах осуществления IFN-γ измеряют в сыворотке субъекта, получающего TIL, полученные способами согласно настоящему изобретению, включая описанные, например, на фиг. 1 (в частности, например, фиг. 1B).

[001423] В некоторых вариантах осуществления TIL, полученные способами согласно настоящему изобретению, включая описанные, например, на фиг. 1 (в частности, например, фиг. 1B), демонстрируют повышенную поликлональность по сравнению с TIL, полученными другими способами, включая способы, не проиллюстрированные на фиг. 1 (в

частности, например, фиг. 1B), такие как, например, способы, называемые способами процесса 1C. В некоторых вариантах осуществления значительно улучшенная поликлональность и/или повышенная поликлональность свидетельствует об эффективности лечения и/или повышенной клинической эффективности. В некоторых вариантах осуществления поликлональность относится к разнообразию репертуара Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления повышение поликлональности может свидетельствовать об эффективности лечения в отношении введения TIL, полученных способами согласно настоящему изобретению. В некоторых вариантах осуществления поликлональность повышена в один, два, десять, 100, 500 или 1000 раз по сравнению с TIL, полученными с использованием способов, отличных от предложенных в настоящем документе, включая, например, способы, отличные от воплощенных на фиг. 1 (в частности, например, фиг. 1B). В некоторых вариантах осуществления поликлональность повышена в один раз по сравнению с пациентом, не получавшим лечения, и/или по сравнению с пациентом, получавшим TIL, полученные с использованием способов, отличных от предложенных в настоящем документе, включая, например, способы, отличные от воплощенных на фиг. 1 (в частности, например, фиг. 1B). В некоторых вариантах осуществления поликлональность повышена в два раза по сравнению с пациентом, не получавшим лечения, и/или по сравнению с пациентом, получавшим TIL, полученные с использованием способов, отличных от предложенных в настоящем документе, включая, например, способы, отличные от воплощенных на фиг. 1 (в частности, например, фиг. 1B). В некоторых вариантах осуществления поликлональность повышена в десять раз по сравнению с пациентом, не получавшим лечения, и/или по сравнению с пациентом, получавшим TIL, полученные с использованием способов, отличных от предложенных в настоящем документе, включая, например, способы, отличные от воплощенных на фиг. 1 (в частности, например, фиг. 1B). В некоторых вариантах осуществления поликлональность повышена в 100 раз по сравнению с пациентом, не получавшим лечения, и/или по сравнению с пациентом, получавшим TIL, полученные с использованием способов, отличных от предложенных в настоящем документе, включая, например, способы, отличные от воплощенных на фиг. 1 (в частности, например, фиг. 1B). В некоторых вариантах осуществления поликлональность повышена в 500 раз по сравнению с пациентом, не получавшим лечения, и/или по сравнению с пациентом, получавшим TIL, полученные с использованием способов, отличных от предложенных в настоящем документе, включая, например, способы, отличные от воплощенных на фиг. 1 (в частности, например, фиг. 1B). В некоторых вариантах осуществления поликлональность повышена в 1000 раз по сравнению с пациентом, не получавшим лечения, и/или по сравнению с пациентом, получавшим TIL, полученные с использованием способов, отличных от предложенных в настоящем документе, включая, например, способы, отличные от воплощенных на фиг. 1 (в частности, например, фиг. 1B).

[001424] Показатели эффективности могут включать в себя частоту контроля заболевания (ЧКЗ), а также общую частоту ответа (ОЧО), как известно в данной области

техники, а также описано в настоящем документе.

1. **Способы лечения рака и других заболеваний**

[001425] Композиции и способы, описанные в настоящем документе, можно применять в способе лечения заболеваний. В одном из вариантов осуществления они предназначены для лечения гиперпролиферативных расстройств. Они также могут применяться для лечения других расстройств, как описано в настоящем документе и в следующих абзацах.

[001426] В некоторых вариантах осуществления гиперпролиферативное расстройство представляет собой рак. В некоторых вариантах осуществления гиперпролиферативное расстройство представляет собой солидную раковую опухоль. В некоторых вариантах осуществления солидная раковая опухоль выбрана из группы, состоящей из глиобластомы (GBM), рака желудочно-кишечного тракта, меланомы, рака яичника, рака шейки матки, немелкоклеточного рака легкого (НМРЛ), рака легкого, рака мочевого пузыря, рака молочной железы, рака, вызванного вирусом папилломы человека, рака головы и шеи (включая плоскоклеточную карциному головы и шеи (ПКГШ)), рака почки и почечно-клеточной карциномы. В некоторых вариантах осуществления гиперпролиферативное расстройство представляет собой гематологическое злокачественное новообразование. В некоторых вариантах осуществления солидная раковая опухоль выбрана из группы, состоящей из хронического лимфоцитарного лейкоза, острого лимфобластного лейкоза, диффузной крупноклеточной В-клеточной лимфомы, неходжкинской лимфомы, лимфомы Ходжкина, фолликулярной лимфомы и мантийноклеточной лимфомы.

[001427] В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой гипермутированный фенотип рака. Гипермутированные раковые заболевания подробно описаны в Campbell, et al. (Cell, 171:1042-1056 (2017); включен в настоящий документ посредством ссылки в полном объеме для всех целей). В некоторых вариантах осуществления гипермутированные опухоли содержат от 9 до 10 мутаций на мегабазу (Mb). В некоторых вариантах осуществления гипермутированные опухоли у детей содержат 9,91 мутаций на мегабазу (Mb). В некоторых вариантах осуществления гипермутированные опухоли у взрослых содержат 9 мутаций на мегабазу (Mb). В некоторых вариантах осуществления повышенно гипермутированные опухоли содержат от 10 до 100 мутаций на мегабазу (Mb). В некоторых вариантах осуществления повышенно гипермутированные опухоли у детей содержат от 10 до 100 мутаций на мегабазу (Mb). В некоторых вариантах осуществления повышенно гипермутированные опухоли у взрослых содержат от 10 до 100 мутаций на мегабазу (Mb). В некоторых вариантах осуществления сверхгипермутированные опухоли содержат более 100 мутаций на мегабазу (Mb). В некоторых вариантах осуществления сверхгипермутированные опухоли у детей содержат более 100 мутаций на мегабазу (Mb). В некоторых вариантах осуществления сверхгипермутированные опухоли у взрослых содержат более 100 мутаций на мегабазу (Mb).

[001428] В некоторых вариантах осуществления гипермутированные опухоли имеют мутации в путях репаративной репликации. В некоторых вариантах осуществления гипермутированные опухоли имеют мутации в ДНК-полимеразах, связанных с репаративной репликацией. В некоторых вариантах осуществления гипермутированные опухоли обладают микросателлитной нестабильностью. В некоторых вариантах осуществления сверхгипермутированные опухоли имеют мутации в ДНК-полимеразах, связанных с репаративной репликацией, и обладают микросателлитной нестабильностью. В некоторых вариантах осуществления гипермутация в опухоли коррелирует с ответом на ингибиторы иммунных контрольных точек. В некоторых вариантах осуществления гипермутированные опухоли устойчивы к лечению ингибиторами иммунных контрольных точек. В некоторых вариантах осуществления гипермутированные опухоли можно лечить с использованием TIL согласно настоящему изобретению. В некоторых вариантах осуществления гипермутация в опухоли вызвана факторами окружающей среды (внешним воздействием). Например, УФ-излучение может быть основной причиной большого количества мутаций при злокачественной меланоме (см., например, Pfeifer, G.P., You, Y.H., and Besaratinia, A. (2005). Mutat. Res. 571, 19-31.; Sage, E. (1993). Photochem. Photobiol. 57, 163-174.). В некоторых вариантах осуществления гипермутация в опухоли может быть вызвана более чем 60 канцерогенами в табачном дыме для опухолей легкого и гортани, а также других опухолей, из-за прямого воздействия мутагенов (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). В некоторых вариантах осуществления гипермутация в опухоли вызвана нарушением регуляции фермента, редактирующего мРНК аполипопротеина B, члена семейства каталитических полипептидов (APOBEC), что, как было показано, приводит к повышенным уровням переходов C в T для целого ряда видов 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). В некоторых вариантах осуществления гипермутация в опухоли вызвана дефектной репаративной репликацией ДНК вследствие мутаций, которые влияют на коррекцию, которая выполняется основными репликативными ферментами Pol3 и Pold1. В некоторых вариантах осуществления гипермутация в опухоли вызвана дефектами коррекционной репарации 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). В некоторых вариантах осуществления мутации репаративной репликации ДНК также встречаются при синдромах предрасположенности к раку, таких как конституциональная или двуаллельная недостаточность коррекционной репарации (CMMRD), синдром Линча и полипоз, связанный с коррекцией полимеразой (PPAP).

[001429] В одном из вариантов осуществления изобретение включает способ

лечения рака с применением популяции TIL, где рак представляет собой гипермутированный рак. В одном из вариантов осуществления изобретение включает способ лечения рака с применением популяции TIL, где рак представляет собой повышенно гипермутированный рак. В одном из вариантов осуществления изобретение включает способ лечения рака с применением популяции TIL, где рак представляет собой сверхгипермутированный рак.

[001430] В одном из вариантов осуществления изобретение включает способ лечения рака с применением популяции TIL, в котором пациент предварительно получает немиелоаблативную химиотерапию перед инфузией TIL согласно настоящему изобретению. В одном из вариантов осуществления немиелоаблативная химиотерапия представляет собой циклофосфамид 60 мг/кг/сут в течение 2 дней (дни 27 и 26 перед инфузией TIL) и флударабин 25 мг/м^2/сут в течение 5 дней (дни с 27 по 23 перед инфузией TIL). В одном из вариантов осуществления после немиелоаблативной химиотерапии и инфузии TIL (в день 0) согласно настоящему изобретению пациент получает внутривенную инфузию IL-2 в дозе 720000 МЕ/кг раз в 8 часов до достижения физиологической толерантности.

[001431] Эффективность описанных в настоящем документе соединений и комбинаций соединений при лечении, предупреждении и/или контроле указанных заболеваний или расстройств можно тестировать с использованием различных моделей, известных в данной области техники, которые определяют руководящие принципы лечения заболеваний у человека. Например, модели для определения эффективности лечения рака яичника описаны, например, в Mullany, *et al.*, *Endocrinology* **2012,** *153,* 1585-92; и Fong, *et al.*, *J. Ovarian Res.* **2009,** *2,* 12. Модели для определения эффективности лечения рака поджелудочной железы описаны в Herreros-Villanueva, *et al.*, *World J. Gastroenterol.* **2012,** *18,* 1286-1294. Модели для определения эффективности лечения рака молочной железы описаны, например, в Fantozzi, *Breast Cancer Res.* **2006,** *8,* 212. Модели для определения эффективности лечения меланомы описаны, например, в Damsky, *et al.*, *Pigment Cell & Melanoma Res.* **2010,** *23,* 853-859. Модели для определения эффективности лечения рака легкого описаны, например, в Meuwissen, *et al.*, *Genes & Development*, **2005,** *19,* 643-664. Модели для определения эффективности лечения рака легкого описаны, например, в Kim, *Clin. Exp. Otorhinolaryngol.* **2009,** *2,* 55-60; и Sano, *Head Neck Oncol.* **2009,** *1,* 32.

[001432] В некоторых вариантах осуществления IFN-гамма (IFN-γ) свидетельствует об эффективности лечения при лечении гиперпролиферативного расстройства. В некоторых вариантах осуществления IFN-γ в крови субъектов, получающих TIL, свидетельствует о наличии активных TIL. В некоторых вариантах осуществления используют определение содержания действующего вещества по продукции IFN-γ. Продукция IFN-γ является еще одним показателем цитотоксического потенциала. Продукция IFN-γ может быть измерена путем определения уровней цитокина IFN-γ в крови субъекта, получающего TIL, полученные способами согласно настоящему изобретению, включая описанные, например, на фиг. 1 (в частности, например, фиг. 1B). В некоторых

вариантах осуществления TIL, полученные с помощью настоящего способа, обеспечивают повышенный уровень IFN-γ в крови субъектов, получавших TIL согласно настоящему способу, по сравнению с субъектами, получавшими TIL, полученными с использованием способов, называемых процессом Gen 3, как проиллюстрировано на фиг. 1 (в частности, например, фиг. 1B) и в тексте данной заявки. В некоторых вариантах осуществления увеличение IFN-γ свидетельствует об эффективности лечения у пациента, получающего TIL, полученные способами согласно настоящему изобретению. В некоторых вариантах осуществления IFN-γ увеличен в один, два, три, четыре или пять или более раз по сравнению с пациентом, не получавшим лечения, и/или по сравнению с пациентом, получавшим TIL, полученные с использованием способов, отличных от предложенных в настоящем документе, включая, например, способы, отличные от воплощенных на фиг. 1 (в частности, например, фиг. 1B). В некоторых вариантах осуществления секреция IFN-γ увеличена в один раз по сравнению с пациентом, не получавшим лечения, и/или по сравнению с пациентом, получавшим TIL, полученные с использованием способов, отличных от предложенных в настоящем документе, включая, например, способы, отличные от воплощенных на фиг. 1 (в частности, например, фиг. 1B). В некоторых вариантах осуществления секреция IFN-γ увеличена в два раза по сравнению с пациентом, не получавшим лечения, и/или по сравнению с пациентом, получавшим TIL, полученные с использованием способов, отличных от предложенных в настоящем документе, включая, например, способы, отличные от воплощенных на фиг. 1 (в частности, например, фиг. 1B). В некоторых вариантах осуществления секреция IFN-γ увеличена в три раза по сравнению с пациентом, не получавшим лечения, и/или по сравнению с пациентом, получавшим TIL, полученные с использованием способов, отличных от предложенных в настоящем документе, включая, например, способы, отличные от воплощенных на фиг. 1 (в частности, например, фиг. 1B). В некоторых вариантах осуществления секреция IFN-γ увеличена в четыре раза по сравнению с пациентом, не получавшим лечения, и/или по сравнению с пациентом, получавшим TIL, полученные с использованием способов, отличных от предложенных в настоящем документе, включая, например, способы, отличные от воплощенных на фиг. 1 (в частности, например, фиг. 1B). В некоторых вариантах осуществления секреция IFN-γ увеличена в пять раз по сравнению с пациентом, не получавшим лечения, и/или по сравнению с пациентом, получавшим TIL, полученные с использованием способов, отличных от предложенных в настоящем документе, включая, например, способы, отличные от воплощенных на фиг. 1 (в частности, например, фиг. 1B). В некоторых вариантах осуществления IFN-γ измеряют с использованием набора для ELISA от Quantikine. В некоторых вариантах осуществления IFN-γ измеряют с использованием набора для ELISA от Quantikine. В некоторых вариантах осуществления IFN-γ измеряют в TIL *ex vivo* у пациента, получавшего TIL, полученные способами согласно настоящему изобретению. В некоторых вариантах осуществления IFN-γ измеряют в крови пациента, получавшего TIL, полученные способами согласно настоящему изобретению. В некоторых вариантах осуществления IFN-γ измеряют в сыворотке пациента, получавшего

TIL, полученные способами согласно настоящему изобретению.

[001433] В некоторых вариантах осуществления TIL, полученные способами согласно настоящему изобретению, включая описанные, например, на фиг. 1 (в частности, например, фиг. 1B), демонстрируют повышенную поликлональность по сравнению с TIL, полученными другими способами, включая способы, не проиллюстрированные на фиг. 1 (в частности, например, фиг. 1B), такие как, например, способы, называемые способами процесса 1C. В некоторых вариантах осуществления значительно улучшенная поликлональность и/или повышенная поликлональность свидетельствует об эффективности лечения и/или повышенной клинической эффективности для лечения рака. В некоторых вариантах осуществления поликлональность относится к разнообразию репертуара Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления повышение поликлональности может свидетельствовать об эффективности лечения в отношении введения TIL, полученных способами согласно настоящему изобретению. В некоторых вариантах осуществления поликлональность повышена в один, два, десять, 100, 500 или 1000 раз по сравнению с TIL, полученными с использованием способов, отличных от предложенных в настоящем документе, включая, например, способы, отличные от воплощенных на фиг. 1 (в частности, например, фиг. 1B). В некоторых вариантах осуществления поликлональность повышена в один раз по сравнению с пациентом, не получавшим лечения, и/или по сравнению с пациентом, получавшим TIL, полученные с использованием способов, отличных от предложенных в настоящем документе, включая, например, способы, отличные от воплощенных на фиг. 1 (в частности, например, фиг. 1B). В некоторых вариантах осуществления поликлональность повышена в два раза по сравнению с пациентом, не получавшим лечения, и/или по сравнению с пациентом, получавшим TIL, полученные с использованием способов, отличных от предложенных в настоящем документе, включая, например, способы, отличные от воплощенных на фиг. 1 (в частности, например, фиг. 1B). В некоторых вариантах осуществления поликлональность повышена в десять раз по сравнению с пациентом, не получавшим лечения, и/или по сравнению с пациентом, получавшим TIL, полученные с использованием способов, отличных от предложенных в настоящем документе, включая, например, способы, отличные от воплощенных на фиг. 1 (в частности, например, фиг. 1B). В некоторых вариантах осуществления поликлональность повышена в 100 раз по сравнению с пациентом, не получавшим лечения, и/или по сравнению с пациентом, получавшим TIL, полученные с использованием способов, отличных от предложенных в настоящем документе, включая, например, способы, отличные от воплощенных на фиг. 1 (в частности, например, фиг. 1B). В некоторых вариантах осуществления поликлональность повышена в 500 раз по сравнению с пациентом, не получавшим лечения, и/или по сравнению с пациентом, получавшим TIL, полученные с использованием способов, отличных от предложенных в настоящем документе, включая, например, способы, отличные от воплощенных на фиг. 1 (в частности, например, фиг. 1B). В некоторых вариантах осуществления поликлональность повышена в 1000 раз по сравнению с пациентом, не

получавшим лечения, и/или по сравнению с пациентом, получавшим TIL, полученные с использованием способов, отличных от предложенных в настоящем документе, включая, например, способы, отличные от воплощенных на фиг. 1 (в частности, например, фиг. 1B).

2. **Способы совместного введения**

[001434] В некоторых вариантах осуществления TIL, полученные, как описано в настоящем документе, включая, например, TIL, полученные способом, описанным на этапах с A по F на фиг. 1 (в частности, например, фиг. 1B), могут быть введены в комбинации с одним или более регуляторами иммунных контрольных точек, такими как антитела, описанные ниже. Например, антитела, нацеленные на PD-1, которые могут быть введены совместно с TIL согласно настоящему изобретению, включают, например, не ограничиваясь перечисленным, ниволумаб (BMS-936558, Bristol-Myers Squibb; Opdivo®), пембролизумаб (ламбролизумаб, MK03475 или MK-3475, Merck; Keytruda®), H12.1, PD1.3.1, NAT 105, гуманизированное антитело к PD-1 JS001 (ShangHai JunShi), моноклональное антитело к PD-1 TSR-042 (Tesaro, Inc.), пидилизумаб (mAb к PD-1 CT-011, Medivation), моноклональное антитело к PD-1 BGB-A317 (BeiGene) и/или антитело к PD-1 SHR-1210 (ShangHai HengRui), моноклональное антитело REGN2810 человека (Regeneron), моноклональное антитело MDX-1106 человека (Bristol-Myers Squibb) и/или гуманизированное антитело IgG4 к PD-1 PDR001 (Novartis). В некоторых вариантах осуществления антитело к PD-1 происходит из клона: RMP1-14 (крысиный IgG) - BioXcell, № по каталогу BP0146. Другими подходящими антителами, подходящими для применения в способах, включающих совместное введение с TIL, полученными в соответствии со этапми с A по F, как описано в настоящем документе, являются антитела к PD-1, раскрытые в патенте США № 8008449, включенном в настоящий документ посредством ссылки. В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающая часть специфически связывается с PD-L1 и ингибирует его взаимодействие с PD-1, тем самым 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 для совместного введения с TIL, полученными в соответствии с этапами с A по F, как описано в настоящем документе. Например, антитела, нацеленные на PD-L1 и проходящие клинические исследования, включают BMS-936559 (Bristol-Myers Squibb) и MPDL3280A (Genentech). Другие подходящие антитела, нацеленные на PD-L1, раскрыты в патенте США № 7943743, включенном в настоящий документ посредством ссылки. Специалисту будет ясно, 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, включающих совместное введение с TIL, полученными в соответствии с этапами с A по F, как описано в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления субъекту, которому вводят комбинацию TIL, полученных в соответствии с этапами с A по F, совместно вводят антитело к PD-1, когда пациент имеет тип рака, рефрактерный к введению только антитела к PD-1. В некоторых вариантах

осуществления пациенту вводят TIL в комбинации с антителом к PD-1, когда пациент имеет рефрактерную меланому. В некоторых вариантах осуществления пациенту вводят TIL в комбинации с антителом к PD-1, когда пациент имеет немелкоклеточный рак легкого (НМРЛ).

3. **Необязательное лимфодеплетирующее предварительное кондиционирование пациентов**

[001435] В одном из вариантов осуществления изобретение включает способ лечения рака с применением популяции TIL, в котором пациент предварительно получает немиелоаблативную химиотерапию перед инфузией TIL согласно настоящему изобретению. В одном из вариантов осуществления изобретение включает популяцию TIL для применения в лечении рака у пациента, прошедшего предварительную немиелоаблативную химиотерапию. В одном из вариантов осуществления популяция TIL предназначена для введения путем инфузии. В одном из вариантов осуществления немиелоаблативная химиотерапия представляет собой циклофосфамид 60 мг/кг/сут в течение 2 дней (дни 27 и 26 перед инфузией TIL) и флударабин 25 мг/м^2/сут в течение 5 дней (дни с 27 по 23 перед инфузией TIL). В одном из вариантов осуществления после немиелоаблативной химиотерапии и инфузии TIL (в день 0) согласно настоящему изобретению пациент получает внутривенную инфузию IL-2 (альдеслейкин, коммерчески доступный как PROLEUKIN) в дозе 720 000 МЕ/кг раз в 8 часов до достижения физиологической толерантности. В отдельных вариантах осуществления популяция TIL предназначена для применения в лечении рака в комбинации с IL-2, где IL-2 вводят после популяции TIL.

[001436] Экспериментальные данные показывают, что лимфодеплеция перед адоптивным переносом опухолеспецифических Т-лимфоцитов играет ключевую роль в повышении эффективности лечения за счет устранения регуляторных Т-клеток и конкурирующих элементов иммунной системы («поглотителей цитокинов»). Соответственно, в некоторых вариантах осуществления изобретения у пациента проводят этап лимфодеплеции (иногда также называемый «иммуносупрессивным кондиционированием») перед введением TIL согласно изобретению.

[001437] Как правило, лимфодеплеция достигается с помощью введения флударабина или циклофосфамида (активная форма которого называется мафосфамидом) и их комбинаций. Такие методы описаны 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, все из которых включены в настоящий документ посредством ссылки в полном объеме.

[001438] В некоторых вариантах осуществления флударабин вводят в концентрации от 0,5 мкг/мл до 10 мкг/мл флударабина. В некоторых вариантах осуществления флударабин вводят в концентрации 1 мкг/мл флударабина. В некоторых вариантах осуществления лечение флударабином осуществляют в течение 1 дня, 2 дней, 3 дней, 4 дней, 5 дней, 6 дней или 7 дней, или более. В некоторых вариантах осуществления

флударабин вводят в дозировке 10 мг/кг/сут, 15 мг/кг/сут, 20 мг/кг/сут, 25 мг/кг/сут, 30 мг/кг/сут, 35 мг/кг/сут, 40 мг/кг/сут или 45 мг/кг/сут. В некоторых вариантах осуществления лечение флударабином осуществляют в течение 2-7 дней в дозе 35 мг/кг/сут. В некоторых вариантах осуществления лечение флударабином осуществляют в течение 4-5 дней в дозе 35 мг/кг/сут. В некоторых вариантах осуществления лечение флударабином осуществляют в течение 4-5 дней в дозе 25 мг/кг/сут.

[001439] В некоторых вариантах осуществления мафосфамид, активную форму циклофосфамида, получают в концентрации от 0,5 мкг/мл до 10 мкг/мл путем введения циклофосфамида. В некоторых вариантах осуществления мафосфамид, активную форму циклофосфамида, получают в концентрации 1 мкг/мл путем введения циклофосфамида. В некоторых вариантах осуществления лечение циклофосфамидом осуществляют в течение 1 дня, 2 дней, 3 дней, 4 дней, 5 дней, 6 дней или 7 дней, или более. В некоторых вариантах осуществления циклофосфамид вводят в дозировке 100 мг/м^2/сут, 150 мг/м^2/сут, 175 мг/м^2/сут, 200 мг/м^2/сут, 225 мг/м^2/сут, 250 мг/м^2/сут, 275 мг/м^2/сут или 300 мг/м^2/сут. В некоторых вариантах осуществления циклофосфамид вводят внутривенно (т. е. в/в). В некоторых вариантах осуществления лечение циклофосфамидом осуществляют в течение 2-7 дней в дозе 35 мг/кг/сут. В некоторых вариантах осуществления лечение циклофосфамидом осуществляют в течение 4-5 дней в дозе 250 мг/м^2/сут в/в. В некоторых вариантах осуществления лечение циклофосфамидом осуществляют в течение 4 дней в дозе 250 мг/м^2/сут в/в.

[001440] В некоторых вариантах осуществления изобретения лимфодеплецию осуществляют путем одновременного введения пациенту флударабина и циклофосфамида. В некоторых вариантах осуществления флударабин вводят в дозе 25 мг/м^2/сут в/в, а циклофосфамид вводят в дозе 250 мг/м^2/сут в/в в течение 4 дней.

[001441] В одном из вариантов осуществления лимфодеплецию осуществляют путем введения циклофосфамида в дозе 60 мг/м^2/сут в течение двух дней с последующим введением флударабина в дозе 25 мг/м^2/сут в течение пяти дней.

4. **Режимы IL-2**

[001442] В одном из вариантов осуществления режим IL-2 включает высокодозовый режим IL-2, где указанный высокодозовый режим IL-2 включает альдеслейкин или его биоаналог или вариант, вводимые внутривенно, начиная со следующего дня после введения терапевтически эффективной части терапевтической популяции TIL, где альдеслейкин или его биоаналог или его вариант вводят в дозе 0,037 мг/кг или 0,044 мг/кг МЕ/кг (массы тела пациента) с использованием 15-минутных внутривенных болюсных инфузий каждые восемь часов до достижения толерантности, всего максимум 14 доз. После 9 дней отдыха эта схема может быть повторена в течение еще 14 доз, всего максимум 28 доз.

[001443] В одном из вариантов осуществления режим IL-2 включает режим с постепенным уменьшением дозы IL-2. Режимы с постепенным уменьшением дозы IL-2 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. В одном из вариантов осуществления режим с постепенным уменьшением дозы IL-2 включает 18 × 10^6 МЕ/м^2, вводимые внутривенно в течение 6 часов с последующим введением 18 × 10^6 МЕ/м^2 внутривенно в течение 12 часов с последующим введением 18 × 10^6 МЕ/м^2 внутривенно в течение 24 часов с последующим введением 4,5 × 10^6 МЕ/м^2 внутривенно в течение 72 часов. Этот курс лечения может быть повторен раз в 28 дней, всего максимум четыре цикла. В одном из вариантов осуществления режим с постепенным уменьшением дозы IL-2 включает18 000 000 МЕ/м^2 в день 1, 9 000 000 МЕ/м^2 в день 2 и 4 500 000 МЕ/м^2 в дни 3 и 4.

[001444] В одном из вариантов осуществления режим IL-2 включает введение пегилированного IL-2 раз в 1, 2, 4, 6, 7, 14 или 21 день в дозе от 0,10 мг/сут до 50 мг/сут.

5. **Адоптивный перенос клеток**

[001445] Адоптивный перенос клеток (ACT) является очень эффективной формой иммунотерапии и включает перенос иммунных клеток с противоопухолевой активностью в организм больных раком. ACT представляет собой подход к лечению, который включает идентификацию *in vitro* лимфоцитов с противоопухолевой активностью, экспансию этих клеток in vitro до больших количеств и их инфузию носителю рака. Лимфоциты, используемые для адоптивного переноса, могут происходить из стромы резецированных опухолей (опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов или TIL). TIL для ACT могут быть получены, как описано в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления TIL получают, например, в соответствии со способом, описанным на фиг. 1 (в частности, например, фиг. 1B). Они также могут быть получены из крови, если они генетически сконструированы для экспрессии противоопухолевых Т-клеточных рецепторов (TCR) или химерных антигенных рецепторов (CAR), обогащены смешанными культурами лимфоцитов и опухолевых клеток (MLTC) или клонированы с использованием аутологичных антигенпрезентирующих клеток и пептидов, происходящих из опухоли. ACT, при котором лимфоциты происходят от хозяина, несущего рак, которому будет проведена инфузия, называется аутологичным ACT. Публикация заявки на патент США № 2011/0052530 относится к способу проведения адоптивной клеточной терапии для стимулирования регрессии рака, в первую очередь для лечения пациентов, страдающих метастатической меланомой, причем указанная публикация включена в отношении этих способов в полном объеме посредством ссылки. В некоторых вариантах осуществления TIL могут быть введены, как описано в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления TIL могут быть введены посредством однократной дозы. Такое введение может осуществляться путем инъекции, например, внутривенной инъекции. В некоторых вариантах осуществления TIL и/или цитотоксические лимфоциты могут быть введены посредством многократных доз. Введение доз может осуществляться один раз, два раза, три раза, четыре раза, пять раз, шесть раз или более шести раз в год. Введение доз может осуществляться один раз в месяц, один раз в две недели, один раз в неделю или один раз в два дня. Введение TIL и/или цитотоксических лимфоцитов может продолжаться столько, сколько необходимо.

6. **Дополнительные способы лечения**

[001446] В еще одном варианте осуществления изобретения предложен способ лечения субъекта, имеющего рак, включающий введение указанному субъекту терапевтически эффективной дозировки терапевтической популяции TIL, описанной в любом из предыдущих абзацев, как применимо выше.

[001447] В еще одном варианте осуществления изобретения предложен способ лечения субъекта, имеющего рак, включающий введение указанному субъекту терапевтически эффективной дозировки композиции TIL, описанной в любом из предыдущих абзацев, как применимо выше.

[001448] В еще одном варианте осуществления изобретения предложен способ лечения субъекта, имеющего рак, описанный в любом из предыдущих абзацев, как применимо выше, модифицированный таким образом, что перед введением терапевтически эффективной дозировки терапевтической популяции TIL и композиции TIL, описанных в любом из предыдущих абзацев, как применимо выше, соответственно, субъекту вводят режим немиелоаблативной лимфодеплеции.

[001449] В еще одном варианте осуществления изобретения предложен способ лечения субъекта, имеющего рак, описанный в любом из предыдущих абзацев, как применимо выше, модифицированный таким образом, что режим немиелоаблативной лимфодеплеции включает этапы введения циклофосфамида в дозе 60 мг/м^2/сут в течение двух дней с последующим введением флударабина в дозе 25 мг/м^2/сут в течение пяти дней.

[001450] В еще одном варианте осуществления изобретения предложен способ лечения субъекта, имеющего рак, описанный в любом из предыдущих абзацев, как применимо выше, модифицированный таким образом, что он дополнительно включает этап лечения указанного субъекта с использованием высокодозового режима IL-2, начиная со следующего дня после введения TIL-клеток указанному субъекту.

[001451] В еще одном варианте осуществления изобретения предложен способ лечения субъекта, имеющего рак, описанный в любом из предыдущих абзацев, как применимо выше, модифицированный таким образом, что высокодозовый режим IL-2 включает 600000 или 720000 МЕ/кг, вводимых в виде 15-минутной внутривенной болюсной инфузии каждые восемь часов до достижения толерантности.

[001452] В еще одном варианте осуществления изобретения предложен способ лечения субъекта, имеющего рак, описанный в любом из предыдущих абзацев, как применимо выше, модифицированный таким образом, что рак представляет собой солидную опухоль.

[001453] В еще одном варианте осуществления изобретения предложен способ лечения субъекта, имеющего рак, описанный в любом из предыдущих абзацев, как применимо выше, модифицированный таким образом, что рак представляет собой меланому, рак яичника, рак шейки матки, немелкоклеточный рак легкого (НМРЛ), рак легкого, рак мочевого пузыря, рак молочной железы, рак, вызванный вирусом папилломы человека, рак головы и шеи (включая плоскоклеточную карциному головы и шеи (ПКГШ)),

глиобластому (включая GBM), рак желудочно-кишечного тракта, рак почки или почечно-клеточную карциному.

[001454] В еще одном варианте осуществления изобретения предложен способ лечения субъекта, имеющего рак, описанный в любом из предыдущих абзацев, как применимо выше, модифицированный таким образом, что рак представляет собой меланому, ПКГШ, раковые заболевания шейки матки, НМРЛ, глиобластому (включая GBM) и рак желудочно-кишечного тракта.

[001455] В еще одном варианте осуществления изобретения предложен способ лечения субъекта, имеющего рак, описанный в любом из предыдущих абзацев, как применимо выше, модифицированный таким образом, что рак представляет собой меланому.

[001456] В еще одном варианте осуществления изобретения предложен способ лечения субъекта, имеющего рак, описанный в любом из предыдущих абзацев, как применимо выше, модифицированный таким образом, что рак представляет собой ПКГШ.

[001457] В еще одном варианте осуществления изобретения предложен способ лечения субъекта, имеющего рак, описанный в любом из предыдущих абзацев, как применимо выше, модифицированный таким образом, что рак представляет собой рак шейки матки.

[001458] В еще одном варианте осуществления изобретения предложен способ лечения субъекта, имеющего рак, описанный в любом из предыдущих абзацев, как применимо выше, модифицированный таким образом, что рак представляет собой НМРЛ.

[001459] В еще одном варианте осуществления изобретения предложен способ лечения субъекта, имеющего рак, описанный в любом из предыдущих абзацев, как применимо выше, модифицированный таким образом, что рак представляет собой глиобластому (включая GBM).

[001460] В еще одном варианте осуществления изобретения предложен способ лечения субъект, имеющего рак, описанный в любом из предыдущих абзацев, как применимо выше, модифицированный таким образом, что рак представляет собой рак желудочно-кишечного тракта.

[001461] В еще одном варианте осуществления изобретения предложен способ лечения субъекта, имеющего рак, описанный в любом из предыдущих абзацев, как применимо выше, модифицированный таким образом, что рак представляет собой гипермутированный рак.

[001462] В еще одном варианте осуществления изобретения предложен способ лечения субъекта, имеющего рак, описанный в любом из предыдущих абзацев, как применимо выше, модифицированный таким образом, что рак представляет собой гипермутированный рак у детей.

[001463] В еще одном варианте осуществления изобретения предложена терапевтическая популяция TIL, описанная в любом из предыдущих абзацев, как применимо выше, для применения в способе лечения субъекта, имеющего рак,

включающем введение указанному субъекту терапевтически эффективной дозировки терапевтической популяции TIL.

[001464] В еще одном варианте осуществления изобретения предложена композиция TIL, описанная в любом из предыдущих абзацев, как применимо выше, для применения в способе лечения субъекта, имеющего рак, включающем введение указанному субъекту терапевтически эффективной дозировки композиции TIL.

[001465] В еще одном варианте осуществления изобретения предложена терапевтическая популяция TIL, описанная в любом из предыдущих абзацев, как применимо выше, или композиция TIL, описанная в любом из предыдущих абзацев, как применимо выше, модифицированная таким образом, что перед введением субъекту терапевтически эффективной дозировки терапевтической популяции TIL, описанной в любом из предыдущих абзацев, как применимо выше, или композиции TIL, описанной в любом из предыдущих абзацев, как применимо выше, субъекту вводят режим немиелоаблативной лимфодеплеции.

[001466] В еще одном варианте осуществления изобретения предложена терапевтическая популяция TIL или композиция TIL, описанная в любом из предыдущих абзацев, как применимо выше, модифицированная таким образом, что режим немиелоаблативной лимфодеплеции включает этапы введения циклофосфамида в дозе 60 мг/м^2/сут в течение двух дней с последующим введением флударабина в дозе 25 мг/м^2/сут в течение пяти дней.

[001467] В еще одном варианте осуществления изобретения предложена терапевтическая популяция TIL или композиция TIL, описанная в любом из предыдущих абзацев, как применимо выше, модифицированная таким образом, что дополнительно включает этап лечения пациента с использованием высокодозового режима IL-2, начиная со следующего дня после введения TIL-клеток указанному пациенту.

[001468] В еще одном варианте осуществления изобретения предложена терапевтическая популяция TIL или композиция TIL, описанная в любом из предыдущих абзацев, как применимо выше, модифицированная таким образом, что высокодозовый режим IL-2 включает 600000 или 720000 МЕ/кг, вводимых в виде 15-минутной внутривенной болюсной инфузии каждые восемь часов до достижения толерантности.

[001469] В еще одном варианте осуществления изобретения предложена терапевтическая популяция TIL или композиция TIL, описанная в любом из предыдущих абзацев, как применимо выше, модифицированная таким образом, что рак представляет собой солидную опухоль.

[001470] В еще одном варианте осуществления изобретения предложена терапевтическая популяция TIL или композиция TIL, описанная в любом из предыдущих абзацев, как применимо выше, модифицированная таким образом, что рак представляет собой меланому, рак яичника, рак шейки матки, немелкоклеточный рак легкого (НМРЛ), рак легкого, рак мочевого пузыря, рак молочной железы, рак, вызванный вирусом папилломы человека, рак головы и шеи (включая плоскоклеточную карциному головы и

шеи (ПКГШ)), глиобластому (включая GBM), рак желудочно-кишечного тракта, рак почки или почечно-клеточную карциному.

[001471] В еще одном варианте осуществления изобретения предложена терапевтическая популяция TIL или композиция TIL, описанная в любом из предыдущих абзацев, как применимо выше, модифицированная таким образом, что рак представляет собой меланому, ПКГШ, раковые заболевания шейки матки, НМРЛ, глиобластому (включая GBM) и рак желудочно-кишечного тракта.

[001472] В еще одном варианте осуществления изобретения предложена терапевтическая популяция TIL или композиция TIL, описанная в любом из предыдущих абзацев, как применимо выше, модифицированная таким образом, что рак представляет собой меланому.

[001473] В еще одном варианте осуществления изобретения предложена терапевтическая популяция TIL или композиция TIL, описанная в любом из предыдущих абзацев, как применимо выше, модифицированная таким образом, что рак представляет собой ПКГШ.

[001474] В еще одном варианте осуществления изобретения предложена терапевтическая популяция TIL или композиция TIL, описанная в любом из предыдущих абзацев, как применимо выше, модифицированная таким образом, что рак представляет собой рак шейки матки.

[001475] В еще одном варианте осуществления изобретения предложена терапевтическая популяция TIL или композиция TIL, описанная в любом из предыдущих абзацев, как применимо выше, модифицированная таким образом, что рак представляет собой НМРЛ.

[001476] В еще одном варианте осуществления изобретения предложена терапевтическая популяция TIL или композиция TIL, описанная в любом из предыдущих абзацев, как применимо выше, модифицированная таким образом, что рак представляет собой глиобластому (включая GBM).

[001477] В еще одном варианте осуществления изобретения предложена терапевтическая популяция TIL или композиция TIL, описанная в любом из предыдущих абзацев, как применимо выше, модифицированная таким образом, что рак представляет собой рак желудочно-кишечного тракта.

[001478] В еще одном варианте осуществления изобретения предложена терапевтическая популяция TIL или композиция TIL, описанная в любом из предыдущих абзацев, как применимо выше, модифицированная таким образом, что рак представляет собой гипермутированный рак.

[001479] В еще одном варианте осуществления изобретения предложена терапевтическая популяция TIL или композиция TIL, описанная в любом из предыдущих абзацев, как применимо выше, модифицированная таким образом, что рак представляет собой гипермутированный рак у детей.

[001480] В еще одном варианте осуществления изобретения предложено

применение терапевтической популяции TIL, описанной в любом из предыдущих абзацев, как применимо выше, в способе лечения рака у субъекта, включающем введение указанному субъекту терапевтически эффективной дозировки терапевтической популяции TIL.

[001481] В еще одном варианте осуществления изобретения предложено применение композиции TIL, описанной в любом из предыдущих абзацев, как применимо выше, в способе лечения рака у субъекта, включающем введение указанному субъекту терапевтически эффективной дозировки композиции TIL.

[001482] В еще одном варианте осуществления изобретения предложено применение терапевтической популяции TIL, описанной в любом из предыдущих абзацев, как применимо выше, или композиции TIL, описанной в любом из предыдущих абзацев, как применимо выше, в способе лечения рака у субъекта, включающем введение указанному субъекту режима немиелоаблативной лимфодеплеции, а затем введение указанному субъекту терапевтически эффективной дозировки терапевтической популяции TIL, описанной в любом из предыдущих абзацев, как применимо выше, или терапевтически эффективной дозировки композиции TIL, описанной в любом из предыдущих абзацев, как применимо выше.

[001483] В еще одном варианте осуществления изобретения предложено применение терапевтической популяции TIL или композиции TIL, описанной в любом из предыдущих абзацев, как применимо выше, модифицированное таким образом, что режим немиелоаблативной лимфодеплеции включает этапы введения циклофосфамида в дозе 60 мг/м^2/сут в течение двух дней с последующим введением флударабина в дозе 25 мг/м^2/сут в течение пяти дней.

[001484] В еще одном варианте осуществления изобретения предложено применение терапевтической популяции TIL или композиции TIL, описанной в любом из предыдущих абзацев, как применимо выше, модифицированное таким образом, что оно дополнительно включает этап лечения пациента с использованием высокодозового режима IL-2, начиная со следующего дня после введения TIL-клеток указанному пациенту.

[001485] В еще одном варианте осуществления изобретения предложено применение терапевтической популяции TIL или композиции TIL, описанной в любом из предыдущих абзацев, как применимо выше, модифицированное таким образом, что высокодозовый режим IL-2 включает 600000 или 720000 МЕ/кг, вводимых в виде 15-минутной внутривенной болюсной инфузии каждые восемь часов до достижения толерантности.

[001486] В еще одном варианте осуществления изобретения предложено применение терапевтической популяции TIL или композиции TIL, описанной в любом из предыдущих абзацев, как применимо выше, модифицированное таким образом, что рак представляет собой солидную опухоль.

[001487] В еще одном варианте осуществления изобретения предложено применение терапевтической популяции TIL или композиции TIL, описанной в любом из

предыдущих абзацев, как применимо выше, модифицированное таким образом, что рак представляет собой меланому, рак яичника, рак шейки матки, немелкоклеточный рак легкого (НМРЛ), рак легкого, рак мочевого пузыря, рак молочной железы, рак, вызванный вирусом папилломы человека, рак головы и шеи (включая плоскоклеточную карциному головы и шеи (ПКГШ)), глиобластому (включая GBM), рак желудочно-кишечного тракта, рак почки или почечно-клеточную карциному.

[001488] В еще одном варианте осуществления изобретения предложено применение терапевтической популяции TIL или композиции TIL, описанной в любом из предыдущих абзацев, как применимо выше, модифицированное таким образом, что рак представляет собой меланому, ПКГШ, раковые заболевания шейки матки, НМРЛ, глиобластому (включая GBM) и рак желудочно-кишечного тракта.

[001489] В еще одном варианте осуществления изобретения предложено применение терапевтической популяции TIL или композиции TIL, описанной в любом из предыдущих абзацев, как применимо выше, модифицированное таким образом, что рак представляет собой меланому.

[001490] В еще одном варианте осуществления изобретения предложено применение терапевтической популяции TIL или композиции TIL, описанной в любом из предыдущих абзацев, как применимо выше, модифицированное таким образом, что рак представляет собой ПКГШ.

[001491] В еще одном варианте осуществления изобретения предложено применение терапевтической популяции TIL или композиции TIL, описанной в любом из предыдущих абзацев, как применимо выше, модифицированное таким образом, что рак представляет собой рак шейки матки.

[001492] В еще одном варианте осуществления изобретения предложено применение терапевтической популяции TIL или композиции TIL, описанной в любом из предыдущих абзацев, как применимо выше, модифицированное таким образом, что рак представляет собой НМРЛ.

[001493] В еще одном варианте осуществления изобретения предложено применение терапевтической популяции TIL или композиции TIL, описанной в любом из предыдущих абзацев, как применимо выше, модифицированное таким образом, что рак представляет собой глиобластому (включая GBM).

[001494] В еще одном варианте осуществления изобретения предложено применение терапевтической популяции TIL или композиции TIL, описанной в любом из предыдущих абзацев, как применимо выше, модифицированное таким образом, что рак представляет собой рак желудочно-кишечного тракта.

[001495] В еще одном варианте осуществления изобретения предложено применение терапевтической популяции TIL или композиции TIL, описанной в любом из предыдущих абзацев, как применимо выше, модифицированное таким образом, что рак представляет собой гипермутированный рак.

[001496] В еще одном варианте осуществления изобретения предложено

применение терапевтической популяции TIL или композиции TIL, описанной в любом из предыдущих абзацев, как применимо выше, модифицированное таким образом, что рак представляет собой гипермутированный рак у детей.

[001497] **ПРИМЕРЫ**

[001498] Варианты осуществления настоящего изобретения далее описаны со ссылкой на следующие примеры. Эти примеры предоставлены только с целью иллюстрации, и настоящее изобретение никоим образом не следует толковать как ограниченное этими примерами, напротив, его необходимо толковать как охватывающее любые возможные вариации, очевидные в свете изложенных в настоящем документе принципов.

ПРИМЕР 1: ПРИГОТОВЛЕНИЕ СРЕД ДЛЯ ПРОЦЕССОВ PRE-REP И REP

[001499] В данном примере описана процедура приготовления сред для культивирования тканей для применения в протоколах, связанных с культивированием опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов (TIL), полученных из различных типов опухолей, включая, не ограничиваясь перечисленным, метастатическую меланому, плоскоклеточную карциному головы и шеи (ПКГШ), карциному яичника, трижды негативную карциному молочной железы и аденокарциному легкого. Эти среды можно применять для получения любых TIL, описанных в настоящей заявке и примерах.

Приготовление CM1

[001500] Из холодильной камеры извлекали следующие реагенты и подогревали их на водяной бане при 37 °C: (RPMI1640, сыворотка группы AB человека, 200 мМ L-глутамин). Готовили среду CM1 в соответствии с приведенной ниже таблицей 19 путем добавления каждого из ингредиентов в верхнюю секцию фильтрующего устройства на 0,2 мкм, соответствующего фильтруемому объему. Хранили при 4 °C.

ТАБЛИЦА 19: Приготовление CM1

Ингредиент	Конечная концентрация	Конечный объем 500 мл	Конечный объем IL
RPMI1640	NA	450 мл	900 мл
Сыворотка группы AB человека, термоинактивированная, 10%	50 мл	100 мл	
200 мМ L-глутамин	2 мМ	5 мл	10 мл
55 мМ BME	55 мкМ	0,5 мл	1 мл
50 мг/мл гентамицина сульфата	50 мкг/мл	0,5 мл	1 мл

[001501] В день применения предварительно подогревали необходимое количество

СМ1 на водяной бане при 37°С и добавляли 6000 МЕ/мл IL-2.

[001502] Дополнительные добавки - по мере необходимости в соответствии с таблицей 20.

ТАБЛИЦА 20: Дополнительные добавки в СМ1, по мере необходимости.

Добавка	**Концентрация исходного раствора**	**Разведение**	**Конечная концентрация**
GlutaMAX™	200 мМ	1:100	2 мМ
Пенициллин/стрептомицин	10 000 ЕД/мл пенициллина 10 000 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

[001503] Вынимали приготовленную СМ1 из холодильника или готовили свежую СМ1, как описано выше в таблице 19. Вынимали AIM-V® из холодильника и готовили необходимое количество СМ2 путем смешивания приготовленной СМ1 с равным объемом AIM-V® в стерильной бутыли для среды. Добавляли в среду СМ2 3000 МЕ/мл IL-2 в день применения. Готовили достаточное количество СМ2 с 3000 МЕ/мл IL-2 в день применения. Промаркировали бутыль со средой СМ2, указав ее название, инициалы приготовившего ее лица, дату ее фильтрации/приготовления, двухнедельный срок годности, и хранили при 4°С до тех пор, пока она не понадобилась для культивирования тканей.

Приготовление СМ3

[001504] Готовили СМ3 в тот день, когда ее было необходимо использовать. СМ3 была такой же, как среда AIM-V®, с добавлением 3000 МЕ/мл IL-2 в день применения. Готовили количество СМ3, достаточное для экспериментальных нужд, путем добавления исходного раствора IL-2 непосредственно в бутыль или пакет с AIM-V. Хорошо перемешивали осторожным встряхиванием. Промаркировали бутыль «3000 МЕ/мл IL-2» сразу после добавления к AIM-V. Если образовывался избыток СМ3, его хранили в бутылях при 4°С с указанием названия среды, инициалов приготовившего ее лица, даты приготовления среды и срока ее годности (7 дней после приготовления). Выбрасывали среды с добавлением IL-2 после 7 дней хранения при 4 °С.

Приготовление СМ4

[001505] СМ4 была такой же, как СМ3, с дополнительной добавкой 2 мМ GlutaMAX™ (конечная концентрация). На каждый 1 л СМ3 добавляли 10 мл 200 мМ GlutaMAX™. Готовили количество СМ4, достаточное для экспериментальных нужд, путем добавления исходного раствора IL-2 и исходного раствора GlutaMAX™

непосредственно в бутыль или пакет с AIM-V. Хорошо перемешивали осторожным встряхиванием. Промаркировали бутыль «3000 МЕ/мл IL-2 и G1utaMAX» сразу после добавления к AIM-V. Если образовывался избыток СМ4, его хранили в бутылях при 4°С с указанием названия среды, «G1utaMAX», и срока ее годности (7 дней после приготовления). Выбрасывали среды с добавлением IL-2 после 7 дней хранения при 4 °С.

ПРИМЕР 2: ПРИМЕНЕНИЕ КОКТЕЙЛЯ ЦИТОКИНОВ IL-2, IL-15 И IL-21

[001506] В данном примере описано применение цитокинов IL-2, IL-15 и IL-21, которые служат дополнительными факторами роста Т-клеток, в сочетании с процессом TIL из примеров с А по G.

[001507] Используя процессы, описанные в настоящем документе, TIL были выращены из колоректальной опухоли, меланомы, опухолей шейки матки, трижды негативного рака молочной железы, легкого и почки в присутствии IL-2 в одной экспериментальной группе и комбинации IL-2, IL-15 и IL-21 вместо IL-2 в другой группе в начале культивирования. По завершении pre-REP культуры оценивали на экспансию, фенотип, функцию (CD107a+ и IFN-γ) и репертуар TCR Vβ. IL-15 и IL-21 описаны в других местах настоящего документа и в Gruijl, *et al.*, IL-21 способствует экспансии CD27+CD28+ опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов с высоким цитотоксическим потенциалом и низкой параллельной экспансией регуляторных Т-клеток, *Santegoets, S. J.,* J Transl Med., **2013,** *11:*37 (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3626797/).

[001508] Результаты показали, что в условиях обработки IL-2, IL-15 и IL-21 наблюдалась усиленная экспансия TIL (>20%) как в $CD4^+$, так и в $CD8^+$ клетках в нескольких тканях по сравнению с условиями в присутствии только IL-2. Наблюдался сдвиг в сторону преимущественно $CD8^+$ популяции с неравномерным репертуаром TCR Vβ в TIL, полученных из культур, обработанных IL-2, IL-15 и IL-21, по сравнению с культурами, обработанными только IL-2. IFN-γ и CD107a были повышены в TIL, обработанных IL-2, IL-15 и IL-21, по сравнению с TIL, обработанными только IL-2.

ПРИМЕР 3: ПРИГОТОВЛЕНИЕ ИСХОДНОГО РАСТВОРА IL-2 (CELLGENIX)

[001509] В этом примере описывается процесс растворения очищенного лиофилизированного рекомбинантного интерлейкина 2 человека для получения исходных образцов, подходящих для применения в дальнейших протоколах культивирования тканей, включая все описанные в настоящей заявке и примерах, включая те, которые включают использование rhIL-2.

Процедура

[001510] Готовили 0,2% раствор уксусной кислоты (HAc). Вносили 29 мл стерильной воды в коническую пробирку на 50 мл. В коническую пробирку на 50 мл добавляли 1 мл 1 н. уксусной кислоты. Хорошо перемешивали, перевернув пробирку 2-3 раза. Стерилизовали раствор HAc фильтрацией с использованием фильтра Steriflip.

[001511] Готовили 1% HSA в PBS. Добавляли 4 мл 25% исходного раствора HSA к 96 мл PBS в стерильном фильтрующем устройстве на 150 мл. Фильтровали раствор. Хранили при 4 °С. Заполняли формы для каждого приготовленного флакона с rhIL-2.

[001512] Готовили исходный раствор rhIL-2 (конечная концентрация 6×10^6 МЕ/мл). Каждая партия rhIL-2 отличалась, и требовалась информация, содержащаяся в сертификате качества производителя (СК), например: 1) масса rhIL-2 на флакон (мг), 2) удельная активность rhIL-2 (МЕ/мг) и 3) рекомендуемый объем восстановления 0,2% HAc (мл).

[001513] Рассчитывали объем 1% HSA, необходимый для партии rhIL-2, используя приведенное ниже уравнение:

$$\left(\frac{Vial\ Mass\ (mg)\ x\ Biological\ Activity\ (\frac{IU}{mg})}{6x10^6\ \frac{IU}{mL}}\right) - HAc\ vol\ (mL) = 1\%\ HSA\ vol\ (mL)$$

[001514] Например, согласно СК партии 10200121 rhIL-2 от CellGenix удельная активность для флакона на 1 мг составляет 25×10^6 МЕ/мг. Рекомендуется восстанавливать rhIL-2 в 2 мл 0,2% HAc.

$$\left(\frac{1mg\ x\ 25x10^6\ \frac{IU}{mg}}{6x10^6\ \frac{IU}{mL}}\right) - 2mL = 2.167mL\ HSA$$

[001515] Протирали резиновую пробку флакона с IL-2 спиртовой салфеткой. С помощью иглы 16G, присоединенной к шприцу объемом 3 мл, вводили рекомендуемый объем 0,2% HAc во флакон. Следили за тем, чтобы не сдвинуть пробку при извлечении иглы. Переворачивали флакон 3 раза и вращали, пока весь порошок не растворился. Осторожно снимали пробку и оставляли на спиртовой салфетке. Добавляли во флакон рассчитанный объем 1% HSA.

[001516] Хранение раствора rhIL-2. Для кратковременного хранения (<72 часов) хранили во флаконе при 4 °C. Для длительного хранения (>72 часов) флакон делили на аликвоты меньшего объема и хранили в криопробирках при -20°C до готовности к использованию. Избегали циклов замораживания/размораживания. Задокументированный срок годности составлял 6 месяцев с даты приготовления. Этикетки rh-IL-2 включали название производителя и номер по каталогу, номер партии, срок годности, инициалы лаборанта, концентрацию и объем аликвоты.

ПРИМЕР 4: ПРОЦЕСС КРИОСЕРВАЦИИ

[001517] В этом примере описан метод процесса криоконсервации для TIL, приготовленных с помощью сокращенной процедуры в закрытой среде, описанной в примере G, с использованием морозильной камеры с контролируемой скоростью замораживания CryoMed, модель 7454 (Thermo Scientific).

[001518] Использовали следующее оборудование: алюминиевый держатель для кассет (совместимый с пакетами для заморозки CS750), кассеты для криоконсервации для пакетов объемом 750 мл, резервуар с жидким азотом низкого давления (22 фунта на кв. дюйм), холодильник, термопарный датчик (ленточный для пакетов) и пакеты для заморозки

CryoStore CS750 (OriGen Scientific).

[001519] Процесс замораживания обеспечивал скорость 0,5°C от зародышеобразования до -20°C и скорость охлаждения 1°C в минуту до конечной температуры -80 °C. Параметры программы следующие: Шаг 1 - выждать при 4 °C; Шаг 2: 1,0 °C/мин (температура образца) до -4 °C; Шаг 3: 20,0 °C/мин (температура камеры) до -45 °C; Шаг 4: 10,0 °C/мин (температура камеры) до -10,0 °C; Шаг 5: 0,5 °C/мин (температура камеры) до -20 °C; и Шаг 6: 1,0 °C/мин (температура образца) до -80 °C.

ПРИМЕР 5: ИЛЛЮСТРАТИВНЫЙ ПРОЦЕСС GEN 3

[001520] В этом примере показано сравнение процессов Gen 2 и Gen 3. В этом примере описана разработка надежной платформы для экспансии TIL. Модификации процесса Gen 2 снижают риск и оптимизируют процесс производства за счет уменьшения количества вмешательств оператора, сокращения общего времени производства, оптимизации использования реагентов и упрощения гибкого полузакрытого и полуавтоматического процесса производства клеток, подходящего для высокопроизводительного производства в промышленных масштабах.

[001521] Процессы TIL Gen 2 и Gen 3 состоят из аутологичных TIL, полученных от отдельного пациента путем хирургической резекции опухоли и затем подвергаемых экспансии ex vivo. Этап примирующей первой экспансии процесса Gen 3 представлял собой культуру клеток в присутствии интерлейкина-2 (IL-2) и моноклонального антитела OKT3, нацеленного на корецептор CD3 Т-клеток, на матрице из облученных мононуклеарных клеток периферической крови (МНПК).

[001522] Производство продуктов TIL Gen 2 состояло из двух этапов: 1) пред-быстрой экспансии (Pre-REP) и 2) протокола быстрой экспансии (REP). Во время Pre-REP резецированные опухоли нарезали на $\leq$ 50 фрагментов по 2-3 мм в каждом измерении, которые культивировали с сывороточной культуральной средой (среда RPMI 1640, содержащая добавку 10% HuSAB) и 6000 МЕ/мл интерлейкина-2 (IL-2) в течение 11 дней. На день 11 TIL собирали и вводили в процесс крупномасштабной вторичной экспансии REP. REP заключается в активации $\leq 200\times10^6$ жизнеспособных клеток из pre-REP при совместном культивировании 5×10^9 облученных аллогенных фидерных клеток МНПК, нагруженных 150 мкг моноклонального антитела к CD3 (OKT3), в объеме 5 л CM2 с добавлением 3000 МЕ/мл rhIL-2 в течение 5 дней. На день 16 объем культуры уменьшают на 90% и разделяют клеточную фракцию на несколько колб с G-REX-500 при $\geq 1\times10^9$ жизнеспособных лимфоцитов/колбу, и доводят объем до 5 л с помощью CM4. TIL инкубируют в течение еще 6 дней. REP собирают на день 22, промывает, готовят препарат и криоконсервируют при -150°C до отправки в место проведения клинического исследования для инфузии.

[001523] Производство продуктов TIL Gen 3 состояло из трех этапов: 1) Протокол примирующей первой экспансии; 2) Протокол быстрой второй экспансии (также называемый фазой быстрой экспансии или REP) и 3) Разделение субкультур. Чтобы осуществить наращивание TIL посредством примирующей первой экспансии,

резецированную опухоль нарезали на ≤ 120 фрагментов по 2-3 мм в каждом измерении. В день 0 примирующей первой экспансии был сформирован фидерный слой из приблизительно $2,5\times10^8$ аллогенных облученных фидерных клеток МНПК на площади поверхности приблизительно 100 $см^2$ в каждом из 3 сосудов 100 MCS. Фрагменты опухоли распределяли и культивировали в 3 сосудах 100 MCS, каждый с 500 мл сывороточной культуральной среды CM1 и 6000 МЕ/мл интерлейкина-2 (IL-2) и 15 мкг OKT-3, в течение 7 дней. На день 7 инициировали REP путем включения дополнительного слоя фидерных клеток из примерно 5×10^8 аллогенных облученных фидерных клеток МНПК в фазу культуры фрагментированной опухоли в каждый из 3100 сосудов MCS, и культивирования с 500 мл культуральной среды CM2 и 6000 МЕ/мл IL-2 и 30 мкг OKT-3. Инициация REP была усилена путем активации всей культуры примирующей первой экспансии в том же сосуде путем переноса фидерных клеток, нагруженных OKT3, в сосуд 100MCS с использованием переноса жидкости в закрытой системе. Для Gen 3 масштабирование или разделение TIL включало этапы процесса, на которых всю клеточную культуру масштабировали путем переноса в более крупный сосуд путем переноса жидкости в закрытой системе (из колбы на 100 М в колбу на 500 М), и были добавлены дополнительные 4 л среды CM4. Клетки REP собирали на день 16, промывали, готовили препарат и криоконсервировали при -150°C до отправки в место проведения клинического исследования для инфузии.

[001524] В целом процесс Gen 3 представляет собой более короткую, более масштабируемую и легко модифицируемую платформу для экспансии, которая удослетворяет критериям надежного производства и сопоставимости процессов.

Таблица 21: Сравнение иллюстративного процесса производства Gen 2 и иллюстративного процесса производства Gen 3.

Этап	**Процесс (Gen 2)**	**Процесс (Gen 3)**
Pre REP - день 0	До 50 фрагментов/ 1-G-Rex 100MCS - 11 дней В 1 л среды CM1 + IL-2 (6000 МЕ/мл)	Целая опухоль, до 120 фрагментов, равномерно разделенных на вплоть до 3 колб. 1 колба: 1-60 фрагментов 2 колбы: 61-89 фрагментов 3 колбы: 90-120 фрагментов 7 дней в 500 мл/колбу среды CM1 + IL-2 (6000 МЕ/мл) $2,5\times10^8$ фидерных клеток/колбу

		15 мкг OKT-3/колбу
Инициация REP	Направление на REP - День 11- <200e^6 TIL (1)G-Rex 500MCS в 5 л среды CM2 IL-2 (3000 МЕ/мл) 5×10^9 фидерных клеток 150 мкг OKT-3	Направление на REP - День 7 - все TIL-клетки - те же G-Rex 100MCS Добавление 500 мл/колбу среды CM2 IL-2 (6000 МЕ/мл) 5×10^8 фидерных клеток/колбу 30 мкг OKT-3/колбу
Наращивание TIL или масштабирование	Уменьшение объема и разделение клеточной фракции на вплоть до 5 G-REX 500MCS 4,5 л среды CM4+IL-2 (3000 МЕ/мл) ≥ 1×10^9 TVC/колбу Разделение день 16	Из каждый G-REX 100MCS (1 л) переносят в 1 G-REX 500MCS Добавление 4 л среды CM4+IL-2 (3000 МЕ/мл) Масштабирование в дни 9-11
Сбор	Сбор, день 22, LOVO-автоматическое устройство для промывки клеток	Сбор, день 16 LOVO-автоматическое устройство для промывки клеток
Готовый препарат	Криоконсервированный продукт 300 МЕ/мл IL2- CS10 в LN_2, несколько аликвот	Криоконсервированный продукт 300 МЕ/мл IL-2-CS10 в LN_2, несколько аликвот
Продолжительность процесса	**22 дня**	**16 дней**

[001525] В день 0 для обоих процессов опухоль 3 раза промывали, и фрагменты были рандомизированы и разделены на два пула - по одному пулу на процесс. Для процесса Gen 2 фрагменты переносили в одну колбу GREX 100MCS с 1 л среды CM1, содержащей 6000 МЕ/мл rhIL-2. Для процесса Gen 3 фрагменты переносили в одну колбу GREX100MCS с

500 мл CM1, содержащей 6000 МЕ/мл rhIL-2, 15 мкг OKT-3 и $2,5\times10^8$ фидерных клеток.

[001526] Высевание TIL для дня инициации Rep происходило в разные дни, в соответствии с каждым процессом. Для процесса Gen 2, в котором объем в колбе G-REX 100MCS был уменьшен на 90%, собранную клеточную суспензию переносили в новую G-REX 500MCS для начала инициации REP на день 11 в среде CM2, содержащей IL-2 (3000 МЕ/мл), плюс 5e9 фидерных клеток и OKT-3 (30 нг/мл). Клетки подвергали экспансии и на день 16 разделяли на несколько колб GREX 500 MCS со средой CM4 с IL-2 (3000 МЕ/мл) согласно протоколу. Затем культуру собирали и криоконсервировали на день 22 согласно протоколу. Для процесса Gen 3 инициация REP произошла на день 7, при этом для инициации REP использовали те же самые G-REX 100MCS. Вкратце, в каждую колбу добавляли 500 мл среды CM2, содержащей IL-2 (6000 МЕ/мл) и 5×10^8 фидерных клеток с 30 мкг OKT-3. На день 9-11 культуру масштабировали. Весь объем G-Rex100M (1 л) переносили в G-REX 500MCS и добавляли 4 л CM4, содержащей IL-2 (3000 МЕ/мл). Колбы инкубировали в течение 5 дней. Культуры собирали и криоконсервировали в день 16.

[001527] В сравнение были включены три разные опухоли: две опухоли легкого (L4054 и L4055) и одна меланомная опухоль (M1085T).

[001528] Среды CM1 (культуральная среда 1), CM2 (культуральная среда 2) и CM4 (культуральная среда 4) готовили заранее и хранили при 4°C для L4054 и L4055. Среды CM1 и CM2 готовили без фильтрации для сравнения роста клеток с фильтрацией среды и без нее.

[001529] Среду для опухоли L4055 подогревали до 37°C за 24 часа до инициации REP и масштабирования.

Обзор результатов

[001530] Gen 3 находится в пределах 30% от Gen 2 по общему количеству жизнеспособных клеток. Готовый продукт Gen 3 демонстрировал более высокую продукцию INF-γ после рестимуляции. Готовый продукт Gen 3 демонстрировал повышенное клональное разнообразие, измеренное по общему количеству присутствующих уникальных последовательностей CDR3. Готовый продукт Gen 3 имел более длинную среднюю длину теломер.

Полученные результаты

Количество клеток и % жизнеспособности:

[001531] Экспансию Pre REP и REP для процессов Gen 2 и Gen 3 проводили в соответствии с приведенным выше описанием.

[001532] **Таблица 22: Количество клеток для Pre-REP.** Для каждой опухоли два пула содержали равное количество фрагментов. Из-за небольшого размера опухолей максимальное количество фрагментов на колбу не было достигнуто. Все клетки с pre-REP (TVC) собирали и подсчитывали на день 11 для процесса Gen 2 и на день 7 для процесса Gen 3. Для сравнения двух групп pre-REP количество клеток делили на количество фрагментов, представленных в культуре, чтобы рассчитать среднее количество жизнеспособных клеток на фрагмент. Как показано в таблице ниже, процесс Gen 2

систематически обеспечивал более высокое количество клеток на фрагмент по сравнению с процессом Gen 3. Экстраполированный расчет количества TVC, ожидаемого для процесса Gen 3 на день 11, который был рассчитан путем деления TVC pre-REP на 7, а затем умножения на 11.

Таблица 22: Количество клеток для Pre-REP

№ опухоли	**L4054**		**L4055***		**M1085T**	
Процесс	**Gen 2**	**Gen 3**	**Gen 2**	**Gen 3**	**Gen 2**	**Gen 3**
TVC pre-REP	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 значение TVC на фрагмент для pre-REP	6,65E+06	2,06E+06	1,12E+06	5,75E+05	7,66E+05	2,18E+05
Экстраполированное значение для Gen 3 на 11 день pre REP	N/A	6,79E+07	N/A	2,17E+07	N/A	5,49E+06

*** L4055, нефильтрованная среда.**

[001533] **Таблица 23: Общее количество жизнеспособных клеток и кратность экспансии готового продукта TIL:** для процессов Gen 2 и Gen 3 TVC подсчитывали для каждого условия процесса и вычисляли процент жизнеспособных клеток для каждого дня процесса. При сборе на 22 (Gen 2) и 16 (Gen 3) день клетки собирали и устанавливали значение TVC. Затем TVC делили на количество фрагментов, предоставленных в день 0, чтобы вычислить среднее количество жизнеспособных клеток на фрагмент. Кратность экспансии рассчитывали путем деления TVC собранных клеток на TVC при инициации REP. Как продемонстрировано в таблице при сравнении Gen 2 и Gen 3, кратности экспансии были аналогичными для L4054; в случае L4055 кратность экспансии была выше для процесса Gen 2. В частности, в этом случае среды были подогреты за 24 часа до дня инициации REP. Более высокая кратность экспансии также наблюдалось в Gen 3 для M1085T. Экстраполированный расчет количества TVC, ожидаемого для процесса Gen 3 на день 22, который был рассчитан путем деления TVC REP на 16, а затем умножения на 22.

Таблица 23: Общее количество жизнеспособных клеток и кратность экспансии готового продукта TIL

№ опухоли	**L4054**		**L4055**		**M1085T**	
Процесс	**Gen 2**	**Gen 3**	**Gen 2**	**Gen 3**	**Gen 2**	**Gen 3**
Кол-во фрагментов	**21**	**21**	**24**	**24**	**16**	**16**

TVC /фрагмент (при сборе)	3,18E+09	8,77E+08	2,30E+09	3,65E+08	7,09E+08	4,80E+08
Инициация REP	1,42E+08	4,32E+07	2,68E+07	1,38E+07	1,23E+07	3,50E+06
Масштабирование	3,36E+09	9,35E+08	3,49E+09	8,44E+08	1,99E+09	3,25E+08
Сбор	6,67E+10	1,84E+10	5,52E+10	8,76E+09	1,13E+10	7,68E+09
Кратность экспансии при сборе/инициации REP	**468,4**	**425,9**	**2056,8**	**634,6**	**925,0**	**2197,2**
Экстраполированное значение для Gen 3 на 22 день сбора REP	**N/A**	**2,53E+10**	**N/A**	**1,20E+10**	**N/A**	**1,06E+10**

*** L4055, нефильтрованная среда.**

[001534] **Таблица 24: % жизнеспособности готового продукта TIL:** после сбора готовые продукты REP TIL сравнивали с критериями выпуска в отношении % жизнеспособности. Все условия для процессов Gen 2 и Gen 3 превзошли критерий 70% жизнеспособности и были сопоставимы по процессам и опухолям.

Таблица 24: % жизнеспособности в REP

№ 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%

[001535] Таблица 25: Оценочное количество клеток на дополнительную колбу для процессов Gen 3. Из-за того, что количество фрагментов в колбе ниже максимально необходимого, для каждой опухоли рассчитывали оценочное количество клеток в день сбора. Оценка была основана на ожидании того, что клинические опухоли были достаточно большими, чтобы засеять 2 или 3 колбы в день 0.

Таблица 25: Экстраполированный расчет оценочного количества клеток на полномасштабные колбы 2 и 3 для процесса Gen 3

№ опухоли	**L4054**		**L4055**		**M1085T**	
Процесс Gen 3	**2 колбы**	**3 колбы**	**2 колбы**	**3 колбы**	**2 колбы**	**3 колбы**

Оценочное собранное количество	3,68E+10	5,52E+10	1,75E+10	2,63E+10	1,54E+10	2,30E+10

ИММУНОФЕНОТИПИРОВАНИЕ:

Сравнение фенотипических маркеров на готовом продукте TIL:

[001536] Три опухоли L4054, L4055 и M1085T были подвергнуты экспансии TIL в обоих процессах Gen 2 и Gen 3. После сбора готовые продукты REP TIL подвергали анализу методом проточной цитометрии для проверки чистоты, дифференцировки и маркеров памяти. Для всех условий процент TCR a/b+ клеток был более 90%.

[001537] TIL, собранные из процесса Gen 3, демонстрировали более высокую экспрессию CD8 и CD28 по сравнению с TIL, собранными из процесса Gen 2. Процесс Gen 2 демонстрировал более высокий процент CD4+. **См. фиг. 3 (A, B, C)**.

Сравнение маркеров памяти на готовом продукте TIL:

[001538] TIL из процесса Gen 3, демонстрировали более высокую экспрессию компартментов центральной памяти по сравнению с TIL из процесса Gen 2. **См. фиг. 4 (A, B, C)**.

Сравнение маркеров активации и истощения на готовом продукте TIL:

[001539] Маркеры активации и истощения анализировали в TIL из двух опухолей, L4054 и L4055, для сравнения готового продукта TIL из процессов экспансии TIL Gen 2 и Gen 3. Маркеры активации и истощения были сопоставимы между процессами Gen 2 и Gen 3. **См. фиг. 5 (A, B); фиг. 6 (A, B).**

СЕКРЕЦИЯ ИНТЕРФЕРОНА-ГАММА ПРИ РЕСТИМУЛЯЦИИ:

[001540] В день сбора, на день 22 для Gen 2 и на день 16 для Gen 3, TIL подвергали рестимуляции в течение ночи с помощью покрытых антителом к CD3 планшетов для L4054 и L4055. Рестимуляцию для M1085T проводили с использованием гранул анти-CD3, CD28 и CD137. Супернатант собирали через 24 часа рестимуляции при всех условиях, и супернатант замораживали. Одновременно проводили анализ IFNγ с помощью ELISA в супернатанте обоих процессов с использованием одного и того же планшета ELISA. Более высокая продукция IFNγ в процессе Gen 3 наблюдалась в трех проанализированных опухолях. **См. фиг. 7 (A, B, C).**

ИЗМЕРЕНИЕ УРОВНЕЙ IL-2 В КУЛЬТУРАЛЬНЫХ СРЕДАХ:

[001541] Чтобы сравнить потребление IL-2 между процессами Gen 2 и Gen 3, клеточный супернатант собирали при инициации REP, масштабировании и в день сбора для опухолей L4054 и L4055. Количество IL-2 в супернатанте клеточной культуры измеряли с помощью набора Quantitate ELISA Kit от R&D. Общая тенденция показывает, что концентрация IL-2 остается выше в процессе Gen 3 по сравнению с процессом Gen 2. Вероятно, это связано с более высокой концентрацией IL-2 при инициации REP (6000 МЕ/мл) для Gen 3 в сочетании с переносом среды на протяжении всего процесса. **См. фиг. 8 (A, B).**

АНАЛИЗ МЕТАБОЛИЧЕСКОГО СУБСТРАТА И МЕТАБОЛИТОВ

[001542] Уровни метаболических субстратов, таких как D-глюкоза и L-глутамин, измеряли в качестве идентификаторов общего потребления среды. Были измерены их соответствующие 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 на высоком уровне вырабатывается во время фазы экспоненциального роста клеток. Высокие уровни лактата отрицательно влияют на процессы культивирования клеток. **См. фиг. 9 (A, B).**

[001543] Отработанную среду для L4054 и L4055 собирали при инициации REP, масштабирования и сбора для обоих процессов Gen 2 и Gen 3. Взятие отработанной среды осуществляли для Gen 2 на день 11, 16 и 22; для Gen 3 - на день 7, 11 и 16.Супернатант анализировали на анализаторе CEDEX Bio-analyzer на концентрацию глюкозы, молочной кислоты, глутамина, Glutamax и аммиака.

[001544] L-глутамин представляет собой нестабильную незаменимую аминокислоту, необходимую в составах сред для культивирования клеток. Глютамин содержит амин, и эта структурная группа амида может переносить и доставлять азот в клетки. При окислении L-глутамина клетка вырабатывает токсичный побочный продукт - аммиак. Чтобы воспрепятствовать разложению L-глутамина, среда для процессов Gen 2 и Gen 3 была дополнена Glutamax, который более стабилен в водных растворах и не разлагается самопроизвольно. В двух линиях опухолевых клеток группа Gen 3 показала снижение уровня L-глутамина и Glutamax во время процесса и увеличение уровня аммиака на протяжении REP. В группе Gen 2 наблюдалась постоянная концентрация L-глутамина и Glutamax, а также наблюдалось небольшое увеличение выработки аммиака. Процессы Gen 2 и Gen 3 были сопоставимы на день сбора в отношении аммиака и продемонстрировали небольшую разницу в разложении L-глутамина. **См. фиг. 10 (A, B, C).**

ТЕЛОМЕРНЫЕ ПОВТОРЫ МЕТОДОМ FLOW - FISH:

[001545] Технология Flow-FISH была использована для измерения средней длины теломерного повтора на L4054 и L4055 для процессов Gen 2 и Gen 3. Определение относительной длины теломер (RTL) рассчитывали с использованием набора Telomere PNA/FITC для анализа методом проточной цитометрии от DAKO. Gen 3 продемонстрировал сопоставимую с Gen 2 длину теломер.

Анализ на CD3

[001546] Для определения клонального разнообразия клеточных продуктов, генерируемых в каждом процессе, из готового продукта TIL, собранного для L4054 и L4055, брали образцы и анализировали в анализе клонального разнообразия посредством секвенирования CDR3 части Т-клеточных рецепторов.

[001547] Таблица 26: Сравнение процентной доли общих уникальных последовательностей CDR3 на L4054 на собранном продукте TIL-клеток для Gen 2 и Gen 3. 199 последовательностей являются общими для готового продукта Gen 3 и Gen 2, что

соответствует 97,07% из лучших 80% уникальных последовательностей CDR3 из Gen 2, общих с готовым продуктом Gen 3.

Таблица 26: Сравнение общих последовательностей uCDR3 между процессами Gen 2 и Gen 3 на L4054.

кол-во uCDR3 (% Перекрытия)	Все uCDR3		Лучшие 80% из 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

[001548] Таблица 27: Сравнение процентной доли общих уникальных последовательностей CDR3 на L4055 на собранном продукте TIL-клеток для Gen 2 и Gen 3. 1833 последовательностей являются общими для готового продукта Gen 3 и Gen 2, что соответствует 99,45% из лучших 80% уникальных последовательностей CDR3 из Gen 2, общих с готовым продуктом Gen 3.

Таблица 27: Сравнение общих последовательностей uCDR3 между процессами Gen 2 и Gen 3 на L4055.

кол-во uCDR3 (% Перекрытия)	Все uCDR3		Лучшие 80% из 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

[001549] Среды CM1 и CM2 готовили заранее без фильтрации и хранили при 4°C до использования для опухоли L4055 в процессах Gen 2 и Gen 3.

[001550] Для опухоли L4055 в день инициации REP для процесса Gen 2 и Gen 3 среду подогревали до вплоть до 37°C за 24 часа.

[001551] LDH в супернатантах, собранных из процессов, не измеряли.

[001552] Подсчет клеток TIL M1085T осуществляли с помощью счетчика клеток K2 cellometer.

[001553] Для опухоли M1085T образцы, такие как супернатант для метаболического анализа, продукт TIL для анализа маркеров активации и истощения, анализа длины теломер и CD3 - TCR vb, были недоступны.

ВЫВОДЫ

[001554] В этом примере сравнивается ткань опухолей от 3 независимых доноров с точки зрения функциональных характеристик качества, а также расширенная фенотипическая характеристика и потребление среды для процессов Gen 2 и Gen 3.

[001555] Сравнение экспансии в pre-REP и REP Gen 2 и Gen 3 оценивали с точки зрения образованного общего количества жизнеспособных клеток и жизнеспособности всей популяции ядросодержащих клеток. Дозы клеток для TVC в день сбора не были сопоставимы между Gen 2 (22 дня) и Gen 3 (16 дней). Дозы клеток Gen 3 были ниже, чем Gen 2, и составляли около 40% от общего количества жизнеспособных клеток, собранных

при сборе.

[001556] Для процесса Gen 3 рассчитывали экстраполированное количество клеток, исходя из предположения, что сбор pre-REP произошел в день 11 вместо дня 7, а сбор REP произошел в день 22 вместо дня 16. В обоих случаях получено более близкое значение TVC в сравнении с процессом Gen 2, что указывает на то, что ранняя активация может в целом обеспечить лучшие показатели при росте TIL. Таблица 4 и 5 нижний ряд.

[001557] В случае экстраполированного значения для дополнительных колб (2 или 3) в процессе Gen 3 исходили из предположения о большем размере обрабатываемой опухоли и достижении максимального количества фрагментов, необходимых для процесса, как описано. Было замечено, что аналогичная доза может быть достигнута на TVC при сборе в день 16 для процесса Gen 3 по сравнению с процессом Gen 2 в день 22. Это наблюдение является важным и свидетельствует о том, что ранняя активация культуры может обеспечить лучшие показатели TIL за меньшее время обработки.

[001558] Сравнение экспансии в pre-REP и REP Gen 2 и Gen 3 оценивали с точки зрения образованного общего количества жизнеспособных клеток и жизнеспособности всей популяции ядросодержащих клеток. Дозы клеток для TVC в день сбора не были сопоставимы между Gen 2 (22 дня) и Gen 3 (16 дней). Дозы клеток Gen 3 были ниже, чем Gen 2, и составляли около 40% от общего количества жизнеспособных клеток, собранных при сборе.

[001559] Что касается фенотипической характеристики, более высокая экспрессия CD8+ и CD28+ наблюдалась на трех опухолях процесса Gen 3 по сравнению с процессом Gen 2. Эти данные показывают, что процесс Gen 3 улучшил характеристики готового продукта TIL по сравнению с Gen 2.

[001560] Процесс Gen 3 демонстрировал немного большее количество компартментов центральной памяти по сравнению с процессом Gen 2.

[001561] Процессы Gen 2 и Gen 3 демонстрировали сопоставимые маркеры активации и истощения, несмотря на более короткую продолжительность процесса Gen 3.

[001562] Продукция IFN гамма (IFNγ) была в 3 раза выше для готового продукта Gen 3 по сравнению с Gen 2 в трех проанализированных опухолях. Эти данные свидетельствуют о том, что процесс Gen 3 обеспечил в высокой степени функциональный и более сильнодействующий продукт TIL по сравнению с процессом Gen 2, вероятно, из-за более высокой экспрессии CD8 и CD28 в Gen 3. Фенотипическая характеристика свидетельствовала о положительных тенденциях в Gen 3 к экспрессии CD8+, CD28+ на трех опухолях по сравнению с процессом Gen 2.

[001563] Длина теломер готового продукта TIL была сопоставимой между Gen 2 и Gen 3.

[001564] Уровни глюкозы и лактата были сопоставимы между готовым продуктом Gen 2 и Gen 3, что дает основания полагать, что уровни питательных веществ в средах процесса Gen 3 не были затронуты из-за отсутствия изъятия среды для уменьшения объема в каждый день процесса и меньшего объема среды в целом, по сравнению с Gen 2.

[001565] В целом процесс Gen 3 продемонстрировал сокращение времени обработки почти в два раза по сравнению с процессом Gen 2, что привело бы к существенному снижению стоимости товаров (COG) для продукта TIL, подвергнутого экспансии с помощью процесса Gen 3.

[001566] Потребление IL-2 указывает на общую тенденцию к потреблению IL-2 в процессе Gen 2, а в процессе Gen 3 уровень IL-2 был выше из-за того, что старую среду не удаляли.

[001567] Процесс Gen 3 продемонстрировал более высокое клональное разнообразие, измеренное анализом последовательности CDR3 TCRab.

[001568] Добавление фидеров и OKT3 в день 0 pre-REP обеспечило раннюю активацию TIL и в целом улучшило показатели TIL роста с использованием процесса Gen 3.

[001569] В таблице 28 описаны различные варианты осуществления и результаты для процесса Gen 3 по сравнению с существующим процессом Gen 2:

Таблица 28: Иллюстративный процесс Gen 3.

Этап	**Процесс Gen 2**	**Процесс Gen 3-Оптимизированный**
Pre REP - день 0	≤50 фрагментов 1X G-Rex 100MCS 1 л среды IL-2 (6000 МЕ/мл) 11 дней	≤240 фрагментов ≤60 фрагментов/колбу ≤4 колб ≤2 л среды (500 мл/колбу) IL-2 (6000 МЕ/мл) $2,5\times10^8$ фидерных клеток/колбу 15 мкг OKT3/колбу
Инициация REP	Свежие TIL направляют на REP День 11 $\leq200e^6$ жизнеспособных клеток 5×10^9 фидерных клеток G-Rex 500MCS 5 л среды CM2+IL-2 (3000 ЕД/мл) 150 мкг OKT3	Свежие TIL направляют на REP День 7 Активация всей культуры 5×10^8 фидерных клеток 30 мкг OKT3/колбу G-Rex 100MCS 500 мл среды+IL-2 (6000 МЕ/мл)

Субкультура или масштабирование TIL	≤5 G-REX 500MCS ≤1×10 жизнеспособных клеток/колбу 5 л/колбу День 16	≤4 G-REX 500MCS Масштабирование всей культуры 4 л/колбу День 10-11
Сбор	Сбор, день 22, LOVO-автоматическое устройство для промывки клеток 2 цикла промывки	Сбор, день 16 LOVO-автоматическое устройство для промывки клеток 5 циклов промывки
Готовый препарат	Криоконсервированный продукт 300 МЕ/мл IL2- CS10 в LN_2, несколько аликвот	Криоконсервированный продукт 300 МЕ/мл IL-2-CS10 в LN_2, несколько аликвот
Продолжительность процесса	22 дня	16 дней

ПРИМЕР 6: ОТБОР И ЭКСПАНСИЯ PD-1+ КЛЕТОК НЕПОСРЕДСТВЕННО EX VIVO: ПРОЦЕСС ДЛЯ УЛУЧШЕНИЯ ОПУХОЛЕРЕАКТИВНЫХ TIL ДЛЯ ACT-ТЕРАПИИ

ВВЕДЕНИЕ

[001570] Адоптивная Т-клеточная терапия аутологичными опухоль-инфильтрирующими лимфоцитами (TIL) продемонстрировала устойчивую частоту ответов в когорте пациентов с метастатической меланомой [1]. Продукты TIL, используемые для лечения, состоят из гетерогенных Т-клеток, которые распознают опухолеспецифические антигены, неоантигены, специфичные для пациента, вызванные мутациями, и антигены, не связанные с опухолью [2, 3]. Исследования показали, что неоантиген-специфические Т-клетки вносят значительный вклад в противоопухолевую активность TIL [4]. Ожидается, что стратегии, обогащающие TIL в отношении противоопухолевой реактивности, дадут более эффективные терапевтические продукты, особенно при эпителиальных видах рака, которые, как известно, содержит высокую долю фоновых Т-клеток [5]. Несколько исследований продемонстрировали, что экспрессия PD1 - маркера, часто связанного с истощением Т-клеток, на TIL является отличительным признаком аутологичных опухолереактивных Т-клеток [6, 7, 8]. В этом примере представлена разработка нового протокола, предназначенного для отбора PD1+ клеток и обогащения продукта TIL аутологичными опухолереактивными Т-клетками. В данном примере представлен протокол для сортировки и экспансии PD1+ TIL и определения характеристик полученного продукта.

[001571] Этот протокол включает экспансию отсортированных ex vivo PD1+ TIL из меланомы, рака легкого, рака молочной железы (трижды негативные и ER/PR опухоли) и саркомы с использованием протокола 2-REP. Подвергнутые экспансии TIL оценивают на предмет роста, жизнеспособности, фенотипа, функции (секреция IFNγ , мобилизация CD107a), уничтожения опухолей (X-CELLigence) и репертуара TCR Vβ (методом проточной цитометрии и РНК-секвенирования). Иллюстративные способы описаны в таблице, представленной на фиг. 7.

[001572] Данный пример охватывает проект отбора PD1, направленный на обогащение продукта TIL TAA-специфичными TIL. Он основан на идее, что опухоле-/неоантиген-специфические Т-клетки отвечают за терапевтическую активность продуктов TIL, и что PD1+ субпопуляция TIL включает опухолереактивные Т-клетки.

СПОСОБЫ - ПРОЦЕДУРА

Подготовка опухоли

[001573] Образцы свежерезецированных опухолей получают от исследовательских альянсов (UPMC, Moffitt) и поставщиков тканей (Biotheme и MTG group). Опухоли отправляют срочной доставкой в HypoThermosol (Biolife Solutions, Вашингтон, № по каталогу 101104) (с антибиотиком) или RPMI 1640 (Fisher Scientific, Пенсильвания, № по каталогу 11875-085) с добавкой сыворотки группы AB человека мужского пола (Access Biologicals, Калифорния, A13012).

[001574] Опухоль вынимают из первичной и вторичной упаковки, взвешивают флакон с опухолью и средой для транспортировки и записывают массу. Опухоль вынимают из флакона и повторно взвешивают флакон и среду для транспортировки. Рассчитывают массу опухоли (масса флакона+среда для транспортировки+опухоль) - (флакон+для транспортировки).

[001575] Фрагментируют всю опухоль на фрагменты размером примерно 4-6 $мм^3$ для гидролиза опухоли. Если опухоль достаточно большая, на обработку отправляют четыре фрагмента по 3 $мм^3$.

Ферментный препарат для гидролиза опухолей

[001576] Лиофилизированные ферменты восстанавливают в количестве стерильного HBSS, указанном для каждого из ферментов для гидролиза, указанных ниже. Эти ферменты готовят в 10-кратной концентрации (10X). Обязательно собирают остатки порошка со стенок бутылок и с защитной фольги на горлышках бутылок. Несколько раз переливают пипеткой, а также вращают, чтобы обеспечить полное восстановление.

[001577] Разводят 1 г коллагеназы IV (Sigma, MO, C5138) в 10 мл HBSS (чтобы приготовить исходный раствор на 100 мг/мл). Перемешивают, переливая пипеткой, для растворения. Если после восстановления препарат не растворился, помещают на баню с H_2O при 37°C на 5 минут. Отмеряют аликвоты во флаконы объемом 1 мл. Получают 10X рабочий исходный раствор коллагеназы на 100 мг/мл.

[001578] Готовят исходный раствор ДНКазы (Sigma, MO, D5025) (10000 МЕ/мл). Единицы ДНКазы для каждой партии указаны в прилагаемой спецификации. Рассчитывают

соответствующий объем HBSS для восстановления 100 мг исходного препарата лиофилизированной ДНКазы. Например, если исходный препарат ДНКазы составляет 2000 Ед/мг, общая ДНКаза в исходном препарате составляет 200000 МЕ (2000 МЕ/мг х 100 мг). Для разведения до рабочего исходного раствора на 10000 МЕ необходимо добавить 20 мл HBSS к 100 мг ДНКазы (200000 МЕ/20 мл=10000 Ед/мл). Отмеряют аликвоты во флаконы объемом 1 мл. Получают 10X рабочий исходный раствор ДНКазы на 10000 МЕ/мл.

[001579] Готовят исходный раствор гиалуронидазы на 10 мг/мл (Sigma, Миссури, H2126). Восстанавливают флакон на 500 мг с помощью 50 мл HBSS с получением исходного раствора на 10 мг/мл. Отмеряют аликвоты во флаконы объемом 1 мл. Получают 10X рабочий исходный раствор гиалуронидазы на10 мг/мл.

Обработка опухолей и гидролиз

[001580] Разводят исходные ферменты для гидролиза до 1-кратной концентрации (1X). Чтобы получить 1X рабочий раствор, добавляют 500 мкл каждой из коллагеназы, ДНКазы и гиалуронидазы на 3,5 мл HBSS.

[001581] При использовании GentleMACS OctoDissociator фрагменты опухоли переносят в пробирку C-Tube от GentleMACS (C-tube) или коническую пробирку на 50 мл в 5 мл коктейля для гидролиза (в HBSS), указанного выше. Переносят 2-3 фрагмента (4-6 мм) в каждую C-tube.

[001582] Переносят каждую C-tube (Miltenyi Biotec, Германия, 130-096-334) в GentleMACS OctoDissociator (Miltenyi Biotec, Германия, 130-095-937). Используют в соответствии с инструкциями производителя. Следует обратить внимание, что гистология каждой опухоли имеет рекомендованную программу для диссоциации опухоли. Выбирают подходящую программу для соответствующей гистологии опухоли. Диссоциация длится примерно один час.

[001583] Если GentleMACS OctoDissociator недоступен, используют стандартный встряхиватель. Помещают 2-3 фрагмента опухоли в коническую пробирку на 50 мл (запечатанную парафильмом, чтобы избежать утечки) и закрепляют на встряхивателе. Помещают встряхиватель в инкубатор с увлажненной атмосферой при 37 °C, 5% CO_2 на постоянное вращение на 1-2 часа. В качестве альтернативы, фрагменты опухоли могут быть подвергнуты гидролизу при комнатной температуре в течение ночи, также при постоянном вращении.

[001584] После гидролиза извлекают C-tube из Octodissociator или встряхивателя. Присоединяют сито на 0,22 мкм к стерильной конической пробирке Falcon. С помощью пипетки переливают все содержимое из C-tube/конической пробирки на 50 мл (5 мл) через сито на 0,22 мкм в коническую пробирку на 50 мл. Промывают C-tube/коническую трубку на 50 мл с помощью 10 мл HBSS и пропускают через сито. Используют плоский конец поршня стерильного шприца, чтобы разделить оставшуюся не подвергшуюся гидролизу опухоль, пропуская ее через фильтр. Добавляют CM1 или HBSS до 50 мл и закрывают пробирку.

[001585] Осаждают образцы центрифугированием, 1500 об/мин, 5 мин при

комнатной температуре. Осторожно удаляют жидкость, ресуспендируют осадок в 5 мл CM1 для подсчета клеток и оценки жизнеспособности.

[001586] Откладывают гидролизат цельной опухоли для следующего: 1. Культивирование клеток (контроль для PD1+ и PD1-) 2. Контроли FMO проточной цитометрии 3. Фенотипирование гидролизата цельной опухоли перед сортировкой 4. Замораживание для анализов противоопухолевой реактивности/уничтожения клеток. Количество отложенных клеток будет зависеть от общего выхода гидролизата и гистологии опухоли.

Подсчет клеток и жизнеспособность

[001587] Процедуры для подсчета клеток и определения жизнеспособности с использованием Nexcelom Cellometer K2 (Nexcelom, Массачусетс) были описаны.

Окрашивание гидролизованной опухоли для анализа методом проточной цитометрии и сортировки клеток

[001588] Гидролизат опухоли будет окрашен коктейлем, который включает инкубацию с ниволумабом и окрашивание фиолетовым live/dead, анти-IgG4 Fc-PE (вторичное антитело к ниволумабу) и CD3-FITC в соответствии со следующими методами.

[001589] После подсчета ресуспендируют клетки в 10 мл HBSS. Осаждают клетки центрифугированием, 1500 об/мин, 5 мин при комнатной температуре (ускорение и замедление 9). Ресуспендируют осадок в 5 мл HBSS. Добавляют 5 мкл синего красителя live/dead (ThermoFisher, Массачусетс, № по каталогу L23105) до конечной концентрации 1/1000. Инкубируют на льду 20-30 мин. Осаждают клетки центрифугированием, 1500 об/мин, 5 мин при комнатной температуре.

[001590] Ресуспендируют осадок в буфере для FACS (1 X HBSS, 1 мМ EDTA, 2% фетальной бычьей сыворотки). Количество добавляемого к осадку буфера для FACS зависит от размера осадка. Объем окрашивания должен быть примерно в 3 раза больше размера осадка. Следовательно, для 300 мкл клеток объем буфера должен быть не менее 900 мкл. Добавляют 1 мкг/мл ниволумаба (Creative Biolabs, Нью-Йорк, № по каталогу TAB-770). Разбавление будет зависеть от исходного раствора антител. Инкубируют при 4°C в течение 30 минут. Ресуспендируют осадок в 5 мл холодного HBSS.

[001591] Осаждают клетки центрифугированием, 1500 об/мин, 5 мин при комнатной температуре (ускорение и замедление 9). Повторяют промывку 2 раза. Ресуспендируют осадок в 5 мл холодного HBSS. Добавляют 5 мкл синего красителя live/dead (ThermoFisher, Массачусетс, № по каталогу L23105) до конечной концентрации 1/1000. Инкубируйте при 4°C в течение 20-30 мин.

[001592] Осаждают клетки центрифугированием, 1500 об/мин, 5 мин при комнатной температуре (ускорение и замедление 9). Как указано выше, ресуспендируют осадок в буфере для FACS (1 X HBSS, 1 мМ EDTA, 2% фетальной бычьей сыворотки). Количество добавляемого к осадку буфера для FACS зависит от размера осадка. Объем окрашивания должен быть примерно в 3 раза больше размера осадка. Следовательно, для 300 мкл клеток объем буфера должен быть не менее 900 мкл.

[001593] Для добавления антител каждые 100 мкл объема эквивалентны одному тесту (титрованное количество антител); т. е. если объем составляет 1 мл, требуется 10-кратное количество титрованного антитела. Добавляют 3 мкл анти-CD3-FITC (BD Biosciences, Нью-Джерси, № по каталогу 561807) на 100 мкл образца. Добавляют анти-IgG4 Fc-PE в концентрации 1:500 (Southern Biotech, Алабама, № по каталогу 9200-09). Следовательно, добавляют 1 мкл анти-IgG4 Fc-PE на каждые 500 мкл буфера для FACS. Инкубируют клетки на льду в течение 30 минут. Защищают от света во время инкубации. Пару раз встряхивают во время инкубации. Ресуспендируют клетки в 20 мл буфера для FACS. Пропускают раствор через клеточное сито на 70 мкм в новую коническую пробирку на 50 мл. Центрифугируют, 1500 об/мин, 5 мин при комнатной температуре (ускорение и замедление 9). Аспирируют. Ресуспендируют клетки до $10e^6$ ВСЕГО (живые+мертвые) в буфере для FACS. Минимальный объем составляет 300 мкл.

[001594] Переносят в стерильные полипропиленовые пробирки для FACS. 3 мл/пробирка для сортировки методом FACS.

Сортировка методом FACS (запуск FX500)

[001595] Во время настройки системы и ожидания завершения калибровки подготавливают следующее:

Подготавливают пять стерильных конических пробирок на 15 мл с 10 мл стерильной деионизированной воды.

Подготавливают пять стерильных пробирок для FACS на 5 мл с 4 мл стерильной деионизированной воды.

Подготавливают пять стерильных конических пробирок на 15 мл с 12 мл 70% EtOH.

Подготавливают пять стерильных конических пробирок на 15 мл с 12 мл 10% гипохлорита натрия.

Сбор образцов

[001596] Убеждаются, что камеры для образцов и сбора находятся при 5 °C, и что вортекс установлен на перемешивание образца. При необходимости регулируют гейт PD1.

[001597] Когда гейты признаны удовлетворительными, регистрируют как можно больше событий (или максимум 20000 событий CD3). Вы можете установить давление образца на 10, чтобы ускорить сбор. Останавливают сбор и вынимают пробирку.

[001598] Открывают дверцу камеры для образцов и загружают в нее блок камеры для сбора на 15 мл. Загружают пробирки для сбора, содержащие буфер для сбора, в блок камеры. Регулируют давление образца так, чтобы эффективность сортировки составляла по меньшей мере 85%. Регистрируют 50000 событий CD3. Если в любой фракции собрано более $4,5\times10^6$ клеток, пробирку(и) для сбора необходимо заменить. Продолжают сортировку, пока в пробирке не закончится образец.

Инициация REP1 (инициация первого этапа экспансии)

[001599] Условие с наименьшим количеством клеток (PD1+ или PD1-) используют для определения количества CD3+ клеток для инициации REP1. Процент CD3 клеток (определяемый во время сортировки) будет использоваться для расчета общего количества

клеток в цельном гидролизате, которое необходимо для инициации REP1 с тем же количеством CD3 клеток, как в образцах PD1+ и PD1-. Общее количество клеток цельного гидролизата для инициации REP 1=Количество отсортированных клеток, инокулированных в REP1/% CD3 клеток.

[001600] Приблизительно 1000-100000 CD3+ клеток помещают в G-Rex 24 или G-Rex10 с 7 мл или 40 мл CM2, соответственно (50% RPMI 1640+10% сыворотки человека, glutamax, гентамицин и 50% AimV), с 3000 МЕ/мл IL-2 на 11 дней. По меньшей мере в одной колбе G-Rex осуществляют инициацию для отсортированных PD1+ и PD1- популяций и гидролизата цельной опухоли. Антитело к CD3 (клон: OKT3) (30 нг/мл) и фидеры (соотношение 1:100 (TIL:фидеры)) добавляют в каждую колбу в начале культивирования.

[001601] Инкубируют клетки в планшетах/колбах в течение 11 дней, не меняя среду (REP1).

[001602] По завершении REP1 удаляют приблизительно 5 мл среды для G-Rex 24 и 30 мл среды для G-Rex 10. Ресуспендируют клетки в оставшейся среде с помощью переливания пипеткой. Помещают клетки в коническую пробирку на 50 мл и центрифугируют при 1500 об/мин в течение 5 мин.

[001603] Аспирируют среду и ресуспендируют клетки в 10-20 мл CM2 для подсчета и оценки жизнеспособности.

Инициация REP2 (инициация второй быстрой экспансии)

[001604] Для инициации мини-REP2 1e5 клеток помещают в G-Rex 10 с 40 мл среды CM2 и 3000 МЕ/мл IL-2. Антитело к CD3 (клон: OKT3) (30 нг/мл) и фидеры (соотношение 1:100, TIL:фидеры) добавляют в начале культивирования.

[001605] Для «полномасштабных прогонов» 2e6-30e6 клеток подвергают экспансии в G-Rex 100M в 1 л среды CM2 и 3000 МЕ/мл IL-2. Антитело к CD3 (клон: OKT3) (30 нг/мл) и фидеры (соотношение 1:100, TIL:фидеры) добавляют в начале культивирования.

[001606] Смену среды (для мелкого масштаба) или смену среды+разделение (для «полномасштабных прогонов») проводят на день 5 REP2 (день 16 процесса). Объем в колбах уменьшают примерно до 10 мл (G-Rex 10) или 100 мл (G-Rex 100M) и доводят до 40 мл (G-Rex 10) или 1 л (G-Rex 100M) с помощью CM2 или AimV+3000 МЕ/мл IL-2. Для «полномасштабных прогонов» колбы разделяют 1:2.

[001607] На день 11 REP2 (или день 22 процесса) объем в колбах уменьшают, центрифугируют их при 1500 об/мин в течение 5 минут при комнатной температуре.

[001608] Готовый продукт оценивают на количество клеток, жизнеспособность, фенотип (TIL1, TIL2 (панель TIL2 для окрашивания поверхностных антигенов TIL), TIL3 и функцию (CD107a (Оценка функции TIL по мобилизации CD107a и анализу IFNγ). Репертуар Vβ оценивают методом FACS (Beckman Coulter, Калифорния, № по каталогу IM3497), который позволяет оценить 24 специфичности (70% от всего семейства Vβ), в соответствии с указаниями производителя. Дополнительные клетки (1e6-5e6 клеток) осаждают и замораживают для РНК-секвенирования и анализа. Готовый продукт также оценивают на противоопухолевую реактивность в анализе совместного культивирования и

оценивают на IFNγ. Когда возможно, размороженные гидролизаты цельных опухолей будут совместно культивированы с TIL и оценены на противоопухолевую реактивность путем совместного культивирования и/или уничтожение (% цитолиза) с использованием системы xCELLigence (ACEA Biosciences, Калифорния).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

[001609] PD1-положительные ($PD1^+$) клетки были отсортированы с помощью проточной цитометрии непосредственно из свежих гидролизатов опухолей и подвергнуты экспансии *in vitro*.

[001610] Были проанализированы образцы шести меланом, трех сарком, шести случаев рака молочной железы и восьми случаев рака легкого.

[001611] Были изучены 3 популяции:

$PD1^+$ отсортированные TIL

PD- отсортированные TIL

Общая масса TIL (несортированный гидролизат цельной опухоли)

[001612] TIL оценивали по выходу (количество клеток), фенотипу (проточная цитометрия), репертуару TCR Vβ (РНК-секвенирование), неспецифической функциональности (анти-CD3 и PMA), а также противоопухолевой реактивности и уничтожению (анализы совместного культивирования).

[001613] Был разработан протокол для экспансии PD1-отобранных TIL до клинически значимых количеств из меланомы, рака легкого, рака молочной железы и саркомы.

[001614] Экспансия in vitro PD1-отобранных TIL давала продукты, фенотипически сопоставимые с общей массой TIL.

[001615] Маркеры Т-клеток активированы по сравнению с TIL до сортировки, что свидетельствует о высоком уровне активации. Маркеры Т-клеток, регулируемые на поверхности подвергнутых экспансии PD1+ TIL по сравнению с TIL до сортировки, включали PD1 и CD25, и свидетельствуют о высоком уровне активации. Важно отметить, что экспансия PD1+ TIL in vitro давала продукты, фенотипически сопоставимые с общей массой TIL, что свидетельствуют о высоком терапевтическом потенциале. Функциональность подвергнутых экспансии PD1+ TIL была подтверждена устойчивой экспрессией IFNγ и CD107a в ответ на неспецифическую стимуляцию. Подвергнутые экспансии PD1+ TIL демонстрируют олигоклональность по сравнению с PD1--производными TIL и общей массой TIL, что является признаком антиген-управляемой клональной экспансии в месте опухоли. Предварительные данные демонстрируют уничтожение аутологичных опухолевых клеток посредством PD1+ -, но не PD1- -производных TIL.

[001616] PD1+ -производные TIL демонстрируют олигоклональность по сравнению с PD1--производными TIL и общей массой TIL.

[001617] Все продукты TIL являются функциональными, что оценивается с помощью неспецифической стимуляции.

[001618] Уничтожение аутологичных клеток меланомы наблюдали в PD1+ -производных TIL, но не в PD1- -производных TIL и общей массе TIL.

РЕЗУЛЬТАТЫ И КРИТЕРИИ ПРИЕМЛЕМОСТИ

[001619] PD1+ отсортированные клетки будут демонстрировать дефект пролиферативной способности. Выход готового продукта будет > или=1e9. PD1+ клетки будут олигоклональными по сравнению с PD1-. Исходя из предположения, что PD1+ клетки с большей вероятностью будут антигенспецифичными, PD1+ клетки, вероятно, будут проявлять повышенную опухолеспецифическую способность к уничтожению по сравнению с их PD1- аналогами.

ЦИТИРУЕМЫЕ ДОКУМЕНТЫ

[001620] 1. Rosenberg, S.A., et al., Durable complete responses in heavily pretreated patients with metastatic melanoma using T-cell transfer immunotherapy. Clin Cancer Res, 2011. 17(13): p. 4550-7.

[001621] 2. Kvistborg, P., et al., TIL therapy broadens the tumor-reactive CD8(+) T cell compartment in melanoma patients. Oncoimmunology, 2012. 1(4): p. 409-418.

[001622] 3. Simoni, Y., et al., Bystander CD8(+) T cells are abundant and phenotypically distinct in human tumour infiltrates. Nature, 2018. 557(7706): p. 575-579.

[001623] 4. Schumacher, T.N. and R.D. Schreiber, Neoantigens in cancer immunotherapy. Science, 2015. 348(6230): p. 69-74.

[001624] 5. Turcotte, S., et al., Phenotype and function of T cells infiltrating visceral metastases from gastrointestinal cancers and melanoma: implications for adoptive cell transfer therapy. J Immunol, 2013. 191(5): p. 2217-25.

[001625] 6. Inozume, T., et al., Selection of CD8+PD-1+ lymphocytes in fresh human melanomas enriches for tumor-reactive T cells. J Immunother, 2010. 33(9): p. 956-64.

[001626] 7. Gros, A., et al., PD-1 identifies the patient-specific CD8(+) tumor-reactive repertoire infiltrating human tumors. J Clin Invest, 2014. 124(5): p. 2246-59.

[001627] 8. Thommen, D.S., et al., A transcriptionally and functionally distinct PD-1(+) CD8(+) T cell pool with predictive potential in non-small-cell lung cancer treated with PD-1 blockade. Nat Med, 2018.

[001628] 9. Cohen et al., Isolation of neoantigen-specific T cells from tumor and peripheral lymphocytes J Clin Invest. 2015; 125(10):3981-3991.

ПРИМЕР 7: ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЙ ВАРИАНТ ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ ОТБОРА И ЭКСПАНСИИ PD-1+ КЛЕТОК НЕПОСРЕДСТВЕННО EX VIVO: ПРОЦЕСС ДЛЯ УЛУЧШЕНИЯ ОПУХОЛЕРЕАКТИВНЫХ TIL ДЛЯ ACT-ТЕРАПИИ

Исследование: обнаружение PD1 клонами M1H4 и EH12.2H7

[001629] MAb к PD1 MIH4 использовали в ранних исследованиях, основанных на полученных ранее данных. Техническая осуществимость экспансии TIL, отобранных по PD1, и функциональность продукта были продемонстрированы с использованием отсортированных с помощью M1H4 клеток:

[001630] Протокол окрашивания был подготовлен для:

Обеспечения окрашивания всех PD1+ TIL.

Включения конъюгированного антитела к IgG4 для обнаружения предварительно связанных рецепторов.

Использовали протокол с использованием mAb к PD1 EH12.2H7.

[001631] Для дальнейшего определения характеристик протокола сортировки по PD1 с целью проверки того, что выбирается подходящая популяция PD1+, была инициирована новая стратегия сортировки для отбора $PD1^{high}$ TIL с использованием

[001632] Стратегия:

16 опухолей головы и шеи (n=4), меланомы (n=4) и легкого (n=7)

5 экспериментов являются прямыми сравнениями (т. е. $PD1^{+}$ по сравнению с $PD1^{high}$)

Анализ (включает функционал и репертуар TCRvβ)

Таблица 29: Сравнение протоколов

Этап	**Другие протоколы**	**Иллюстративный протокол, используемый в настоящем примере**
Процедура гидролиза	Диссоциатор GentleMACS	Диссоциация в GentleMACS с последующим ficoll (при необходимости)
Коктейль для гидролиза	НЕИЗВЕСТЕН	GMP (в соответствии с требованиями надлежащей производственной практики) коктейль для гидролиза разработан в Iovance Этап без ficoll
Сортировщик клеток	MACSQuantTyto	SONY FX500
Клон PD1, использованный для сортировки	PD1.3.1 (Miltenyi)	EH12.2H7 (BioLegend)+ IgG4
Стратегия сортировки PD1+	PD1+	PD1+ или $PD1^{high}$
Способ культивирования	REP (14 дней)	2 процесса REP (11 дней каждый)

Предварительные результаты и сводный обзор:

[001633] Разница в фенотипе и функциональности подвергнутых экспансии TIL (после REP1 и REP2) и отсортированной PD1high популяции обеспечивает новую стратегию отбора/сортировки.

[001634] Исследования показали, что $PD1^{+}$-отобранные TIL из легкого и меланомы

являются антиген-специфичными и обладают более высокой эффекторной функцией.

[001635] «Холодные» опухоли без активности PD1 (ось PD1/PD-L1) не подходят для отбора по PD1.

[001636] Опухоли с $PD1^{high}$ TIL идеальны для отбора из-за ассоциации клеток $PD1^{high}$ со неоантигенной/опухолевой специфичностью.

[001637] Дальнейшие анализы будут включать фенотипирование, функциональность, физиологию, клональность и анализ на примеси.

Фенотипирование:

[001638] Субпопуляции Т-клеток (памяти/альфа-бета в сравнении с гамма-дельта)

Функциональность

IFNg и гранзим (стимуляция гранулами)

CD107a (стимуляция PMA/IO)

Противоопухолевая реактивность по IFNg, или CD107a/TNF, или гранзиму B

- (Гидролизат опухоли или HLA-совместимый или HLA-несовместимый, или другие раковые антигены)

Анализ уничтожения опухоли (Xcelligence)

Полифункциональность (IsoLight)?

Физиология

Длина теломер

Кратность экспансии клеток

Анализ клеточного цикла, митотический индекс

Маркеры истощения/старения/активации

Клональность

Разнообразие (кол-во уникальных клонов)

Наложение в идентичности уникальных клонов iREP

Индекс энтропии Шеннона

Примеси

Загрязняющие опухолевые клетки, NK-клетки, другие клетки, остатки от процесса

ПРИМЕР 8: ПРОЦЕССЫ ЭКСПАНСИИ ОПУХОЛИ СО СРЕДОЙ С ОПРЕДЕЛЕННЫМ СОСТАВОМ.

[001639] Процессы, раскрытые в примерах с 1 по 7, выполняются с заменой сред CM1 и CM2 средой с определенным составом согласно настоящему изобретению (например, SFM для экспансии Т-клеток CTS™ OpTmizer™, ThermoFisher, включая, например, DM1 и DM2).

ПРИМЕР 9: ОТБОР И ЭКСПАНСИЯ PD-1+ TIL ДЛЯ ПОЛНОМАСШТАБНОГО ПРОИЗВОДСТВА

ЦЕЛЬ

[001640] В этом примере описываются результаты отбора и экспансии PD-1+ TIL в экспериментах по мелко- и полномасштабному производству, как описано в этом примере.

ИНФОРМАЦИЯ

[001641] Несколько исследований продемонстрировали, что поверхностная экспрессия PD-1 - маркера, часто связанного с истощением Т-клеток, является отличительным признаком аутологичных опухолереактивных Т-клеток в микроокружении опухоли. Был разработан протокол для отбора PD-1-положительных (PD-1+) клеток из гидролизатов опухолей для обогащения продукта TIL аутологичными опухолереактивными Т-клетками. Протокол был адаптирован и модифицирован для использования как для мелко-, так и для полномасштабных производств.

ОБЛАСТЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

[001642] Мелкомасштабный процесс Gen 2 с отбором по PD-1+ (PD-1+Gen2) использовали для экспансии отобранных по PD-1+ TIL из одного гидролизата опухоли легкого и одного гидролизата меланомы. Готовые продукты TIL были охарактеризованы в соответствии с протоколом TP-19-004.

[001643] Полномасштабный процесс Gen 2 с отбором по PD-1+ (PD-1+Gen2) использовали для экспансии отобранных по PD-1+ TIL из двух гидролизатов опухолей головы и шеи и одного гидролизата меланомы. Готовые продукты TIL были охарактеризованы в соответствии с протоколом TP-19-004.

ДИЗАЙН ЭКСПЕРИМЕНТА

[001644] Описание мелкомасштабных и полномасштабных производственных процессов показано в таблицах 30, 31 ниже.

[001645] Мелкомасштабные исследования (фаза 1) представляли собой анализ технической осуществимости масштабирования и оптимизации процесса экспансии TIL до клинического масштаба. Дополнительные условия были протестированы для изучения использования среды с определенным составом и раннего REP (укороченного REP 1) в экспансии PD-1+ TIL.

Таблица 30. Обзор мелкомасштабных процессов для культуры PD-1+ TIL (исследование/PD-1+ Gen 2/среда с определенным составом/ранний REP)

Условия	**PD-1+ исследование**	**PD-1+ Gen 2***	**PD-1+ среда с определенным составом Gen 2^ξ**	**PD-1+ ранний REP**
REP-1 **TIL** **Фидеры** **CM2** **IL-2** **OKT3 (30 нг/мл)** **G-Rex**	**День 0**: REP-1 10% от количества отсортированных по PD-1+ Различное соотношение TIL и фидеров	**День 0:** REP-1 10% от количества отсортированных по PD-1+ 10e6 100 мл 3000 МЕ/мл	**День 0:** REP-1 10% от количества отсортированных по PD-1+ 10e6 100 мл 3000 МЕ/мл	**День 0:** REP-1 10% от количества отсортированных по PD-1+ 10e6

	при 1:100 50 мл 3000 МЕ/мл 30 нг/мл 10	30 нг/мл 10М	30 нг/мл 10М	100 мл 3000 МЕ/мл 30 нг/мл 10М
REP-2 **TIL** **Фидеры** **CM2** **IL-2** **OKT3 (30 нг/мл)** **G-Rex**	**День 11:** REP-2 100000 TVC 10e6 50 мл 3000 МЕ/мл 30 нг/мл 10	**День 11:** REP-2 20% TVC 100e6 100 мл 3000 МЕ/мл 30 нг/мл 10М	**День 11:** REP-2 20% TVC 100e6 100 мл 3000 МЕ/мл 30 нг/мл 10М	**День 7:** REP-2 20% TVC 100e6 100 мл 3000 МЕ/мл 30 нг/мл 10М
Масштабирование	Без масштабирования	**День 16:** Уменьшение объема и разделение (TVC/20e6, округление) на вплоть до 5 колб 10М	**День 16:** Уменьшение объема и разделение (TVC/20e6, округление) на вплоть до 5 колб 10М	**День 12:** Уменьшение объема и разделение (TVC/20e6, округление) на вплоть до 5 колб 10М
Сбор в REP-2	**День 22:** Сбор в REP-2	**День 22:** Сбор в REP-2	**День 22:** Сбор в REP-2	**День 17:** Сбор в REP-2
Расчет экстраполяции: **REP-1** **REP-2**	Умножить на собранные TVC на 10 Умножить на собранные TVC на TVC REP-2/1e5	Умножить собранные TVC REP-1 на 10 Умножить собранные REP-2 на 50 х количество колб при разделении	Умножить собранные TVC REP-1 на 10 Умножить собранные REP-2 на 50 х количество колб при разделении	Умножить собранные TVC REP-1 на 10 Умножить собранные REP-2 на 50 х количество колб при разделении

* В PD-1^{neg} Gen 2 и PD-1 общая масса TIL Gen 2 использовались те же условия для мелкомасштабной культуры, что и для PD-1+ Gen 2

^Для условия среды с определенным составом использовали CTS OpTmizer с 3% заменителя сыворотки CTS Immune Cell Serum replacement

Таблица 31. Обзор полномасштабных процессов для культуры PD-1+ TIL (PD-1+ Gen 2)

Условия	**PD-1+ Gen 2**
REP-1 **TIL** **Фидеры** **CM2** **IL-2** **OKT3 (30 нг/мл)** **G-Rex**	**День 0:** REP-1 Количество отсортированных по PD-1+ 100e6 1000 мл 3000 МЕ/мл 30 нг/мл 100MCS
REP-2 **TIL** **Фидеры** **CM2** **IL-2** **OKT3 (30 нг/мл)** **G-Rex**	**День 11:** REP-2 5e6-200e6 TVC 5e9 5 л 3000 МЕ/мл 30 нг/мл 500MCS
Масштабирование	**День 16:** Уменьшение объема и разделение на вплоть до 5 G-Rex500 MCS в CM4+3000 МЕ/мл IL-2
Сбор в REP-2	**День 22:** Сбор в REP-2

[001646] В таблице 31 ниже перечислены опухоли, использованные в этом исследовании, и связанные с ними гистологии.

Таблица 31 Опухоли, использованные в исследовании

Эксперименты	Гистология	Идентификационный №	Дополнительная информация об опухоли
Фаза 1 Мелкомасштабный (1/10-я/1/50-я масштаба предполагаемого клинического процесса производства)			
Мелкомасштабный 1	Легкое	L4093	Идентификационный № поставщика: 535-C055, 0,5 г
Мелкомасштабный 2	Меланома	M1135	Идентификационный № поставщика: 061-Y025, лимфатический узел
Фаза 2 Полномасштабный (предполагаемый клинический процесс производства)			
Полномасштабный 1	Голова и шея	H3032	Идентификационный № поставщика: M4190034 A4, полость рта, 0,35 г
Полномасштабный 2	Меланома	M1137	Идентификационный № поставщика: 093-Y032
Полномасштабный 3	Голова и шея	H3034	Идентификационный № поставщика: 747048A1, 0,3 г

Критерии приемлемости

[001647] Тестирование характеристик этих партий по параметрам, перечисленным в таблицах 3 и 4 ниже, было проведено только в информационных целях.

[001648] В таблице 33 ниже указаны критерии приемлемости, использованные для оценки показателей Фазы 2/полномасштабных партий.

Таблица 33. Тестирование и критерии приемлемости собранного продукта

Тип теста	Метод	Критерий приемлемости
Тестирование в ходе процесса		
Чистота после сортировки (%PD1+)	Проточная цитометрия	$\geq$ 80%
Тестирование при выпуске		
Внешний вид	Визуальный осмотр	Пакет не поврежден, комочков нет
Жизнеспособность клеток	Флуоресценция	$\geq$ 70%
Общее количество жизнеспособных клеток	Флуоресценция	от 1×10^9 до 150×10^9
Принадлежность	Проточная цитометрия	$\geq$ 90% CD45+CD3+

(%CD45+CD3+)		клеток
IFNg (стимулированные - нестимулированные)	Стимуляция гранулами и ELISA	≥ 500 пг/мл

[001649] В таблице 34 ниже указаны дополнительные исследования характеристик готового продукта, проведенные только в информационных целях для полномасштабных партий Фазы 2.

Таблица 34. Определение характеристик готового продукта (только в информационных целях)

Тип теста	Метод	Отчет о результатах
Чистота и фенотип субпопуляции Т-клеток памяти	Проточная цитометрия (LAB-055)	Отчет о результатах
Маркер фенотипа активации и истощения	Проточная цитометрия (LAB-061)	Отчет о результатах
Длина теломер	Flow FISH (Приложение-1)	Отчет о результатах
Гранзим В	Стимуляция гранулами и ELISA (LAB-064)	Отчет о результатах
CD107A	Митогенная стимуляция и проточная цитометрия (LAB-061)	Отчет о результатах
Секвенирование TCR Vбета	Глубокое секвенирование (Irepertoire, Inc)	Отчет о результатах (если есть)
Анализ метаболитов	Биохимический анализатор Cedex	Отчет о результатах

РЕЗУЛЬТАТЫ

Результаты мелкомасштабного анализа технической осуществимости фазы 1

[001650] В исследовании Фазы 1 использовали опухоли легкого (L4093) и меланому (M1135). Вкратце, каждая опухоль была подвергнута ферментативному гидролизу, отсортирована с помощью FACS по PD-1+ клеткам, и следующие культуры были инициированы в день 0 в качестве условий проведения теста:

(1) PD-1+ исследование

(2) PD-1+ Gen 2

(3) PD-1+ среда с определенным составом

(4) PD-1+ ранний REP.

[001651] Также из каждой опухоли были инициированы две дополнительные культуры в качестве контролей. Эти два условия сравнивали с условием PD-1+ для кинетики экспансии и клонотипов TCR-Vбета.

(5) PD-1^{neg} Gen 2

(6) Общая масса TIL Gen 2

[001652] Культуру PD-1+ ранний REP собирали на день 17, тогда как все другие культуры собирали на день 22 (см. таблицу-1a).

Результаты сортировки клеток

[001653] Результаты FACS для двух опухолей, использованных в исследовании Фазы 1, обобщены в таблице 35 ниже.

Таблица 35. Чистота PD-1+ TIL до и после сортировки методом проточной цитометрии.

Свойство	**Легкое (L4093)**	**Меланома (M1135)**
% CD3+	8,17%	1,77%
% PD-1+ (из CD3+)	79%	65%
Прогнозируемое TVC до сортировки (%CD3+PD-1+)	5,6e5 (6,5%)	4,88 e4 (1,2%)
TVC после сортировки (% выход)	4,5e5 (80,7%)	4,8e4 (98,4)
Чистота после сортировки (%PD-1+)**	94%	88%

*Чистота была основана на FSC/CD3+/PD-1+, но не на жизнеспособных клетках, потому что краситель на жизнеспособность не добавляется во время проточной сортировки клеток для последующего культивирования

[001654] % выход и чистота клеток PD-1+ после сортировки были высокими для обеих опухолей. Эти результаты показывают, что экспериментальные параметры, использованные для мелкомасштабного анализа технической осуществимости, были удовлетворительными.

Результаты REP1 и REP2

[001655] Общее количество жизнеспособных клеток (TVC) измеряли после REP-1 и REP-2 с использованием NC 200, и они показаны в таблице 36 ниже. Числа, представленные в таблице для TVC, экстраполированы на полномасштабный процесс с использованием коэффициентов.

Таблица 36. Сводные данные по мелкомасштабному производству и свойствам продукта

		Идентификационный № опухоли							
REP	**Измеренное**	**L4093**				**M1135**			
		PD1+	***PD-***	***PD-1+***	***PD-1+***	***PD-1+***	***PD-***	***PD-***	***PD-1+***

	свойство	***исслед ование***	***1+ Gen 2***	***среда с опред еленн ым соста вом***	***ранний REP***	***исслед ование***	***1+ Gen 2***	***1+ среда с опред еленн ым сост авом***	***ранний REP***
REP-1	TVC высеяно (экстрапол ировано)	4,48e5	4,48e5	4,48e5	4,48e5	4,8e4	4,8e4	4,8e4	4,8e4
	TVC собрано (экстрапол ировано)	599e6	560e6	225e6	44e6	34e6	272e6	256e6	46e6
	Кратность экспансии в REP-1	1336	1249	503	99	705	5670	5334	958
REP-2	TVC высеяно (экстрапол ировано)	599e6	200e6	200e6	44e6	34e6	200e6	200e6	44e6
	TVC собрано (экстрапол ировано)	24e9	97e9	64e9	55e9	4,3e9	99e9	97e9	37e9
	Кратность экспансии в REP-2	40	483	318	1235	128	497	483	811
	% Жизнеспо собности	96	98	95	92	95	98	94	93
	%CD45+C	98,5	96,8	98,2	99,1	88,2	94,3	90,4	98,7

	D3+								
	IFNγ (пг/мл)	4005	4446	5646	14009	1784	3147	2757	4458
	Гранзим B (пг/мл)	8397	7903	10387	46654	3642	3428	6336	25194
	% CD4+CD107A (стимулированные)	НТ	40	44	42	НТ	40	38	55
	% CD8+CD107A (стимулированные)	НТ	68	43	66	НТ	42	47	82

Кратность экспансии=TVC собрано/TVC высеяно

% CD107A был рассчитан из популяции, гейтированной по CD3+CD4+ или CD3+CD8+

[001656] **Выход процесса:** группа PD-1+ Gen 2 эксперимента дала более 200e6 при сборе в REP-1 и более 90e9 TIL с жизнеспособностью > 98% и 94% CD45+CD3+ клеток при сборе в REP-2, что дает основания полагать, что PD1+ Gen 2 является процессом, пригодным для производства достаточного количества клеток для полномасштабного производства. Собранные в REP-1 TIL из условия PD-1+ Gen 2 показали более низкую кратность экспансии по сравнению с условиями PD-1^{neg} или общей массы TIL. Этот вывод согласуется с результатами предыдущих исследований.

[001657] **Функция:** TIL, подвергнутые экспансии из процесса PD-1+ Gen 2, высвобождали IFNγ и гранзим B на уровнях, аналогичных TIL, полученным с использованием процесса Исследования в ответ на стимуляцию гранулами анти-CD3/CD28/CD137 (таблица 34). Продукт REP-1 и REP-2 из условия PD-1+ со средой с определенным составом был аналогичен соответствующим продуктам для условия PD-1+ Gen 2 по всем протестированным параметрам. Интересно, что условие PD-1+ ранний REP с общей продолжительностью культивирования 17 дней (против 22 дней для процесса PD-1+ Gen 2) дало 57% (Rep-1) и 37% (REP-2) от соответствующего условия PD-1+ Gen 2. Кроме того, TIL из PD-1+ ранний REP продуцировали в 2 раза более высокие уровни IFNγ и гранзима B по сравнению с другими условиями, что указывает на то, что TIL из PD-1+ ранний REP, вероятно, активно растут и метаболически более активны, чем TIL, генерируемые в других условиях. Учитывая, что время удвоения TIL в культуре обычно составляет <1 дня, все вместе это дает основания полагать, что сопоставимый выход клеток

(относительно количеств клеток) и более высокая функциональность (относительно высвобождения IFNγ и гранзима B) могут быть достигнуты за счет небольшого увеличения продолжительности культивирования PD-1+ ранний REP до 18 или 19 дней по сравнению с 22 днями для PD-1+ Gen 2. Экспрессия CD107A на поверхности активированных Т-клеток является мерой функции Т-лимфоцитов. Все PD1+ TIL экспрессировали высокие уровни CD107A при стимуляции PMA/IO (как CD4+, так и CD8+ TIL)

[001658] **Продолжительность жизни TIL:** В таблице 37 описана длина теломер TIL, определенная с помощью проточной цитометрии с флуоресцентной гибридизацией in situ (FISH Flow) для сбора в REP-2.

Таблица 37. Сводная информация об относительной длине теломер (RTL) по сравнению с контрольной клеточной линией (1301)

Характеристика TIL	**L4093**		**M1135**	
	PD-1+ Gen 2	***Общая масса TIL Gen 2***	***PD-1+ Gen 2***	***Общая масса TIL Gen 2***
Относительная длина теломер	8,1	5,2	6,5	7,5

[001659] Длину теломер в образцах L4093 и M1135 сравнивали с контрольной клеточной линией (лейкоз 1301). Контроль представляет собой тетраплоидную клеточную линию, имеющую длинные стабильные теломеры, что позволяет рассчитать относительную длину теломер. Теломеры PD1+ TIL были длиннее в одном случае и немного короче в другом случае по сравнению с общей массой TIL, что позволяет предположить, что PD-1+ TIL сохраняли свою продолжительность жизни по сравнению с общей массой TIL.

[001660] **Клональность TIL:** в таблице 38 описана клональность TIL из сбора в REP 2, измеренная по репертуару TCR Vβ.

Таблица 38. Сводная информация по репертуару TCR Vβ для L4093 и M1135

Характеристика TIL	**L4093**		**M1135**	
	PD-1+ Gen 2	***Общая масса TIL Gen 2***	***PD-1+ Gen 2***	***Общая масса TIL Gen 2***
uCDR3	2886	6537	2371	7128
Индекс энтропии Шеннона	5,7	8,1	5,5	8,6
Общая часть с условием общей популяции	46	n/a	12	n/a

[001661] Количество уникальных последовательностей CDR3 для условия PD-1+ Gen2 для TIL как легкого, так и меланомы, было сопоставимым. Кроме того, репертуар TCR Vβ для условия PD-1+ Gen 2 показал более чем 10% перекрытие с соответствующим репертуаром для общей популяции TIL. Индекс разнообразия (энтропия Шеннона) для условия PD-1+ Gen2 был меньше, чем индекс разнообразия для общей популяции TIL, что дает основания полагать, что репертуар TCR Vβ для условия PD1+ Gen 2 менее поликлонален и более олигоклонален, чем соответствующий репертуар для общей популяции TIL.

[001662] **Расширенное фенотипирование:** в таблицах 39-41 описаны результаты расширенного анализа фенотипа TIL. Многоцветная проточная цитометрия использовалась для определения чистоты TIL, принадлежности, субпопуляции памяти, активации и статуса истощения REP-2 TIL.

Таблица 39. Фенотипическая характеристика чистоты, принадлежности и памяти TIL

Характеристика (%)	L4093				M1135			
	PD-1+ исследование	*PD-1+ Gen 2*	*PD-1+ среда с определенным составом*	*PD-1+ ранний REP*	*PD1+ исследование*	*PD-1+ Gen 2*	*PD-1+ среда с определенным составом*	*PD-1+ ранний REP*
NK-клетки	0	0	0,1	0	0	0	0,3	0,1
B-клетки (CD3-CD19+)	0	0	0	0	0	0	0	0
Моноциты (CD14+)	0,1	0,1	0	0	0,1	0	0	0
TCRαβ	98,8	97,9	99,2	99,3	98,7	95,6	98,8	98,8
TCRγδ	0,1	0,1	0,1	0	0,1	0	0	0
$TCR\alpha\beta^+$ $CD4^+$	91,1	79,6	77,8	89,1	75,8	90,6	86,1	90,4
$TCR\alpha\beta^+$ $CD8^+$	8,5	20,2	21,8	10,5	17,4	9	11,1	8,5
Наивные: CCR7+CD45RA+	0	0	0	0	0	0	0	0
T-EM: CCR7-CD45RA	99,9	99,6	99,7	99,8	99,8	99,9	99,7	99,6
T-CM: CCR7+CD45RA	0,1	0,1	0,1	0,2	0,1	0	0,1	0,4
T-CM: CD62L+CD45RA	0	0,1	2	1,3	0	0,6	0,9	7,4

T-EFF/TEMRA: CCR7- CD45RA+	0	0,3	0,2	0	0,1	0	0,1	0

NK-клетки - естественные киллеры, гейтированные по Живые/CD14-/CD3-/CD19-/CD56+ и/или CD16+, B-клетки - гейтированные по Живые/CD14-/CD3-/CD19+, Моноциты - живые/CD14+, TCR αβ - гейтированные по Живые/CD14-/CD3+/TCRγδ-, Клетки памяти - гейтированные по Живые/CD14-/CD3+/TCRγδ-, T-EM - эффекторные, T-CM - центральной памяти, T-EFF/TEMRA - эффекторные/RA+ эффекторной памяти.

Таблица 40: статус активации и истощения CD4+ TIL

Характеристика (CD4+) гейтированные по Живые/CD3+/CD4+ (%)	**L4093**				**M1135**			
	PD-1+ исследование	***PD-1+ Gen 2***	***PD-1+ среда с определенным составом***	***PD-1+ ранний REP***	***PD-1+ исследование***	***PD-1+ Gen 2***	***PD-1+ среда с определенным составом***	***PD-1+ ранний REP***
CD27+	2	2,8	1,5	6,3	2,2	3,8	2,1	3,8
CD28+	99,2	95,7	94,8	98,9	97,9	95,2	93,4	99
CD57+	31	23,1	29,8	14,1	11,4	15,7	13,8	6,7
2B4+	10,1	7,7	13,7	10,8	4,3	1,2	0,8	1,4
BTLA4+	99,7	99,5	99,9	99,9	99,6	99,8	99,8	99,8
***CCR4+**	94,2	85,7	81,7	91,9	99	96	94,8	96,1
CD25+	2,6	2,6	12,3	11,3	35,6	2,5	4,8	45,9
CD69+	31,6	40,2	25	23,6	41,7	28,9	24,2	25,9
CD95+	99,9	99,2	99,8	99,7	99,9	99,2	99	99,9
CD103+	3,6	0,7	1	1,7	1	0,4	0,5	0,7
****CXCR3+**	10,7	12,3	20,2	9,4	4,7	22	6,1	5,5
KLRG1+	6,7	14,7	1,4	11,8	2	1,7	1,1	1,8
LAG3+	10	14,7	4,4	14,3	10,4	15,7	4,3	15,5
PD1+	6,5	1,8	0,4	3,4	7,5	2,4	0,5	4,1
TIGIT+	13,2	9,2	17	36,7	50,8	18	43,6	44,6
TIM3+	93,4	95,7	92,5	98,4	88,3	80,7	86,1	96,9

* Процент был рассчитан из (CXCR3+CCR4+ и CXCR3-CCR4+).

** Процент был рассчитан из (CXCR3-CCR4- и CXCR3+CCR4-).

Таблица 41: статус активации и истощения CD8+ TIL

Характеристика (CD8+)	**L4093**				**M1135**			
	PD-1+	***PD-1+***	***PD-1+ среда***	***PD-1+***	***PD-1+***	***PD-1+***	***PD-1+ среда***	***PD-1+***

гейтированные по Живые/CD3+/ CD8+	***исследование***	***Gen 2***	***с определенным составом***	***ранний REP***	***исследование***	***Gen 2***	***с определенным составом***	***ранний REP***
CD27+ (%)	5,1	6,8	3,7	10,8	2,1	6	13,8	5,4
CD28+ (%)	97,6	93	91,7	96,4	95,8	95,5	88,7	94,6
CD57+ (%)	11,5	4,6	7,1	6,5	12,8	4,8	9	4,5
2B4+ (%)	37,2	17,1	32,9	29,5	0,8	0,8	10,4	1,2
BTLA4+ (%)	99,9	99,8	99,9	100	99,8	100	99,7	99,8
***CCR4+ (%)**	84,1	79,8	67,4	88,7	97,1	86,6	89,1	96,1
CD25+ (%)	1,8	0,7	3,7	9,9	33,8	3,6	1,1	58,2
CD69+ (%)	68,3	52	60,7	52,2	74,2	59	85,2	80,3
CD95+ (%)	99,8	99,2	99,7	99,5	99,9	99,2	99,1	99,5
CD103+ (%)	1,9	17,2	2,9	17,4	0,1	0,4	0,4	1,1
****CXCR3+ (%)**	12,4	18,1	33,7	15,4	5,7	24,4	17,1	6,7
KLRG1+ (%)	24,8	3,5	3,2	15,3	2,8	3,0	1,2	2,8
LAG3+ (%)	34,8	46,2	30,3	45,7	29,6	40,3	28,3	58,2
PD1+ (%)	8,8	5,2	1	4	4,5	1,9	0,4	4
TIGIT+ (%)	77,4	77,6	71,3	91,2	99,3	79,6	86,8	92,9
TIM3+ (%)	90,9	92,8	93,2	97,7	96,5	88,6	96,8	99,2

* Процент был рассчитан из (CXCR3+CCR4+ и CXCR3-CCR4+).

** Процент был рассчитан из (CXCR3-CCR4- и CXCR3+CCR4-).

[001663] PD-1+ Gen 2 TIL состояли в основном из TCR αβ с менее чем 0,2% TCR γδ-клеток. Популяция, отличная от Т-клеток, включая В-клетки, моноциты и NK-клетки, составляла <0,3% каждая. Все условия, включая PD-1+ Gen 2 TIL, были в первую очередь фенотипом эффекторной памяти и менее дифференцированными с высокими уровнями экспрессии CD28+, BTLA+, CD95+.

[001664] Статус активации (CD69+) и истощения (KLRG1+) TIL для условия PD-1+ были сопоставимы с предыдущими результатами для TIL меланомы, полученными с использованием процесса производства Gen 2.

[001665] Основываясь на выходе процесса, функции, фенотипе, PD-1+ Gen 2 продемонстрировал многообещающие характеристики в части качества по сравнению с PD-1+ среда с определенным составом и PD-1+ранний REP.

Результаты полномасштабных экспериментов Фазы 2

[001666] В исследовании Фазы 2 использовали одну меланому (M1137) и две опухоли головы и шеи (H3032 и H3034). Вкратце, каждую опухоль подвергали ферментативному гидролизу, подвергали проточной сортировке на PD-1+ клетки и

начинали культивирование в полном масштабе в день 0 с использованием процесса PD-1+ Gen 2, описанного в таблице 31.

Результаты проточной сортировки

[001667] Результаты проточной сортировки для трех опухолей, использованных в исследовании Фазы 2, обобщены в таблице 42 ниже.

Таблица 42: чистота PD-1+ TIL до и после сортировки методом проточной цитометрии.

Опухоль (идентификационный №)	**Критерий приемлемости**	**Голова и шея (H3032)**	**Меланома (M1137)**	**Голова и шея (H3034)**
% CD3+	N/A	24	13	9
% PD-1+ (из CD3+)	N/A	65	45	77
TVC до сортировки	N/A	5,6e5	7e5	2e5
TVC после сортировки (% выход)	N/A	1,13e5 (20%)	1,9e5 (25%)	5e4 (25%)
*Чистота после сортировки (PD-1%)	≥ 80%	90%	87%	86%

*Чистота была основана на FSC/CD3+/PD1+, но не на жизнеспособных клетках, потому что краситель на жизнеспособность не добавляется во время проточной сортировки клеток для последующего культивирования

[001668] Чистота после сортировки (%PD-1+) для всех трех опухолей удовлетворяла критерию > 80%. Несколько более низкая чистота, наблюдаемая для меланомы по сравнению с опухолями головы и шеи, скорее всего, связана с более низкой экспрессией PD-1+ клеток при сортировке (Приложение-1).

Результаты REP-1 и REP-2

[001669] В таблице 43 приведены сводные данные по общему количеству жизнеспособных клеток и свойствам продукта из трех полномасштабных экспериментов.

Таблица 43: сводные данные по полномасштабному производству и свойствам продукта

	Опухоль (идентификационный №)	**Критерий приемлемости**	**Голова и шея (H3032)**	**Меланома (M1137)**	**Голова и шея (H3034)**
REP-1	TVC высеяно	N/A	8,5e4	1,4e5	3,7e4
	TVC собрано	N/A	1,48e8	7,11e8	8,2e7
	Кратность экспансии в REP-1	N/A	1748	5097	2172
REP-2	TVC высеяно	5-200e6*	148e6	200e6	82e6

	Собранное TVC до LOVO	N/A	32e9	72e9	27e9
	TVC после LOVO (% выход)	1-150e9 (N/A)	29e9 (90%)	69e9 (95,9%)	26e9 (99%)
	Кратность экспансии в REP-2	N/A	195	343	324
	% Жизнеспособности	≥ 70%	94%	95%	92%
	%CD45+/CD3+	> 90%	94%	93%	96%
	IFNγ (пг/мл)	≥ 500	8673	11347	21345
	Гранзим B (пг/мл)	N/A	32229	14652	37412
	% CD4+CD107A (стимулированные)	N/A	52	74	59
	% CD8+CD107A (стимулированные)	N/A	66	88	90

* Диапазон для TVC, высеянных в REP-2, основан на текущем установленном диапазоне для процесса REP Gen 2 и не является формальным критерием приемлемости в протоколе

Кратность экспансии=TVC собрано/TVC высеяно

% CD107A был рассчитан из популяции, гейтированной по CD3+CD4+ или CD3+CD8+

[001670] **Выход процесса:** в конце REP-1 все три PD-1+ TIL претерпели экспансию до более чем 80e6 (>1500-кратная экспансия), с выходом, достаточным для инициации культивирования REP-2. Диапазон 5-200e6 TVC, высеянных в REP-2, основан на текущем процессе Gen 2 REP. При сборе в REP-2 все культуры дали > 26 e9 TVC с выходами после Lovo > 90%.

[001671] **Доза:** дозы готового продукта составили > 26e9 TVC с > 94% жизнеспособностью и 93% CD45+CD3+ клеток, то есть, представляли собой высокообогащенную популяцию TIL.

[001672] **Функция:** функция TIL была охарактеризована на основе рестимуляции PD-1+ TIL в течение ночи с помощью Dynabeads. Супернатанты собирали через 24 часа рестимуляции и замораживали. ELISA на IFNγ и гранзим B проводили на супернатантах. Высвобождение IFNγ удовлетворяло критерию приемлемости, и все три культуры TIL секретировали высокие уровни гранзима B при стимуляции. Аналогично продуктам TIL, полученным в исследованиях Фазы 1, все три PD1+ TIL в значительной степени экспрессировали CD107A при стимуляции PMA/IO (как CD4+, так и CD8+ TIL).

[001673] **Продолжительность жизни TIL:** относительная длина теломер PD-1+ TIL для H3032, M1137, H3034 составляла 7, 4,1 и 5,2, соответственно и была сопоставима с Gen 2 (QP-17-011R01).

[001674] **Клональность TIL:** данные еще не получены.

[001675] **Расширенное фенотипирование:** в таблицах 44 и 45 описан расширенный анализ фенотипа TIL. Многоцветная проточная цитометрия использовалась для определения чистоты TIL, принадлежности, субпопуляции памяти, активации и статуса истощения REP-2 TIL.

Таблица 44. Фенотипическая характеристика чистоты, принадлежности и памяти TIL

Характеристика (%)	H3032	M1137	H3034
NK-клетки (CD3-CD56+)	0,1	0	0,1
B-клетки (CD3-CD19+)	0	0	0
Моноциты (CD14+)	0	0	0
TCRαβ	92,2	97	97,8
TCRγδ	0,5	0,3	0,3
TCRαβ+ CD4+	93,7	89,1	92,9
TCRαβ+ CD8+	5,7	10,1	2,1
Наивные: CCR7+CD45RA+	0	0	0
T-EM: CCR7-CD45RA-	96,4	97,3	99,3
T-CM: CCR7+CD45RA-	2,5	2,6	0,6
T-EFF/TEMRA: CCR7-CD45RA+	1,1	0,1	0,1
T-CM: CD62L+CD45RA-	7,6	11,7	3,5

Таблица 45. Статус активации и истощения TIL

Характеристика (%)	CD4+			CD8+		
	H3032	M1137	H3034	H3032	M1137	H3034
CD27+	15,6	20,4	6	10,3	20,3	4,9
CD28+	76,4	78,6	83,9	90	90	76,9
CD57+	27,7	35,2	22,3	12,7	22	10,5
2B4+	3,4	4,1	0,6	4,3	4	0,7
BTLA4+	83,4	91,1	83,6	88,7	87	68,3
*CCR4+	29,4	17,4	17,3	16,1	10,2	2,3
CD25+	30,1	4,2	17,3	23,1	2,3	7,8
CD69+	14	9,8	39,7	26,7	18,5	75
CD95+	98,9	99,2	99,8	99,5	98,3	99,7
CD103+	5,7	3,8	7,9	0	0	0,1
**CXCR3+	86,3	92,8	80,3	7,3	8,1	1,5
KLRG1+	6	23,5	6,9	10,2	12,1	10,1

LAG3+	8,3	5,4	1,5	21,2	10,5	5,4
PD1+	6	1,4	0,9	14,7	5,6	1,3
TIGIT+	5,9	0,4	10,1	34,4	18,7	20,9
TIM3+	79,6	84,3	77	73,5	86,1	60

* Процент был рассчитан из (CXCR3+CCR4+ и CXCR3-CCR4+). ** Процент был рассчитан из (CXCR3-CCR4- и CXCR3+CCR4-).

[001676] В готовых собранных TIL отсутствовали детектируемые B-клетки, моноциты или NK-клетки (таблица -14). REP TIL в основном состоит из TCR αβ с дифференцировкой эффекторной памяти.

[001677] Все три PD-1+ TIL, по-видимому, являются CD4-доминантным фенотипом с фенотипом эффекторной памяти и высокой экспрессией CD27 (таблица 44).

[001678] Маркер истощения KLRG1 составил менее 13%, за исключением M1137 (таблица 45). Уровни CD57, BTLA4, LAG3, PD1+, TIGIT были аналогичны предыдущим результатам для TIL меланомы, полученным с использованием процесса производства Gen 2.

[001679] **Анализ метаболитов:** отработанные среды собирали в последний день сбора для всех условий. Супернатант анализировали на биоанализаторе CEDEX на уровни глюкозы, лактата, аммиака, глутамина, Glutamax и холестерина (Приложение 3). Уровни глюкозы, глутамина и холестерина в условиях PD-1+ Gen 2 были сопоставимы с условиями общей массы TIL. Уровни Glutamax для условий PD-1+ Gen 2 немного выше, чем для общей массы TIL, что дает основания полагать, что доступность питательных веществ не была ограничивающим фактором для роста культуры. Побочные продукты, такие как лактат и аммиак, были сопоставимы с общей массой TIL.

НЕСООТВЕТСТВИЯ И ОТКЛОНЕНИЯ

[001680] Образцы готового продукта PD-1+ TIL из полномасштабных экспериментов были отправлены в iRepertoire для секвенирования TCR Vβ. В отчет будут внесены поправки, как только данные будут доступны.

[001681] Из-за ограниченного количества материала мелкие масштабы, проведенные для L4093 и M1135, были проведены в масштабе 1/50, а не масштабе 1/100. Вместо переноса 10% объема, максимум клеток 2e6, в колбу G-Rex 5M, переносили 20% объема, максимум 4e6 клеток. На масштабирование повлияло изменение формулы масштабирования с TVC/10e6, округление, максимум 5, на TVC/20e6, округление, максимум 5. Эти изменения приводят к окончательной экстраполяции в 50 раз, а не в 100 раз, для экстраполяции на полноразмерный масштаб. Подробные сведения в предыдущих разделах этого отчета отражают это изменение.

ВЫВОДЫ

[001682] Процесс PD-1+ Gen 2 был разработан в полномасштабном варианте для экспансии PD-1+ TIL до > 25e9 за 22 дня. Все характеристики, такие как фенотипическая характеристика, включая чистоту, память, активацию, маркеры истощения и функцию TIL,

генерированных с использованием процесса PD-1+ Gen 2, были сопоставимы с Gen 2 для меланомы.

[001683] Сводная таблица 46:

Параметры тестирования	**Критерий приемлемости**	**ГиШ 3032**	**M1137**	**ГиШ 3034**
Внешний вид	Пакет не поврежден, комочков нет	Соответствует	Соответствует	Соответствует
Жизнеспособность клеток	≥ 70%	Соответствует	Соответствует	Соответствует
Общее количество жизнеспособных клеток	от 1×10e9 до 150×10e9	Соответствует	Соответствует	Соответствует
Принадлежность (%CD3/%CD45+)	> 90% CD3+CD45+ клеток	Соответствует	Соответствует	Соответствует
IFNγ(стимулированные - нестимулированные)	≥ 500 пг/мл	Соответствует	Соответствует	Соответствует

[001684] Процесс PD-1+ Gen2 был выбран для дальнейшей разработки продукта TIL, отобранных по PD-1.

[001685] На основании результатов, полученных в мелком масштабе, были проведены дополнительные эксперименты с условием PD-1+ ранний REP для определения характеристик процесса экспансии PD-1+ до более короткой продолжительности 17-19 дней без ущерба для дозы или функции продукта. См. фиг. 156.

Цитируемые источники для примера 10:

1. Rosenberg, S.A., et al., Durable complete responses in heavily pretreated patients with metastatic melanoma using T-cell transfer immunotherapy. Clin Cancer Res, 2011. 17(13): p. 4550-7.

2. Kvistborg, P., et al., TIL therapy broadens the tumor-reactive CD8(+) T cell compartment in melanoma patients. Oncoimmunology, 2012. 1(4): p. 409-418.

3. Simoni, Y., et al., Bystander CD8(+) T cells are abundant and phenotypically distinct in human tumour infiltrates. Nature, 2018. 557(7706): p. 575-579.

4. Schumacher, T.N. and R.D. Schreiber, Neoantigens in cancer immunotherapy. Science, 2015. 348(6230): p. 69-74.

5. Turcotte, S., et al., Phenotype and function of T cells infiltrating visceral metastases

from gastrointestinal cancers and melanoma: implications for adoptive cell transfer therapy. J Immunol, 2013. 191(5): p. 2217-25.

6. Inozume, T., et al., Selection of CD8+PD-1+ lymphocytes in fresh human melanomas enriches for tumor-reactive T cells. J Immunother, 2010. 33(9): p. 956-64.

7. Gros, A., et al., PD-1 identifies the patient-specific CD8(+) tumor-reactive repertoire infiltrating human tumors. J Clin Invest, 2014. 124(5): p. 2246-59.

8. Thommen, D.S., et al., A transcriptionally and functionally distinct PD-1(+) CD8(+) T cell pool with predictive potential in non-small-cell lung cancer treated with PD-1 blockade. Nat Med, 2018.

Таблица 47: сводные данные по экспансии TIL (экстраполированные на полный масштаб) для L4093

Условие для L4093	REP1-День 0	REP1-День 7	REP1-день 11 (кратность экспансии)	REP2-день17	REP2-день22
Исследование	448000	NA	5,99E+08 (1336)	NA	2,42E+10
Gen 2.1 -подобный PD-1+	448000	NA	5,60E+08 (1249)	NA	9,66E+10
Gen 2.1 -подобный PD-1+ (среда с опр. составом)	448000	NA	2,25E+08 (503)	NA	6,37E+10
Gen 2.1 -подобный PD-1-	448000	NA	8,75E+08 (1954)	NA	7,16E+10
Gen 2.1 -подобный общая масса TIL	448000	NA	1,80E+09 (4022)	NA	8,58E+10
17-дневный ранний REP	448000	4,43E+07	NA	5,5E+10	NA

Таблица 48: сводные данные по экспансии TIL (экстраполированные на полный масштаб) для M1135

Условие для M1135	REP1-День 0	REP1-День 7	REP1-день 11 (кратность экспансии)	REP2-день17	REP2-день22
Исследование	48000	NA	3,38E+07 (705)	NA	4,34E+09
Gen 2.1 -подобный PD-1+	48000	NA	2,72E+08 (5670)	NA	9,94E+10
Gen 2.1 -подобный PD-1+ (среда с опр.	48000	NA	2,56E+08 (5334)	NA	9,65E+10

составом)					
Gen 2.1 -подобный PD-1-	48000	NA	2,73E+08 (5693)	NA	2,10E+09
Gen 2.1 -подобный общая масса TIL	48000	NA	1,52E+09 (31604)	NA	9,16E+10
17-дневный ранний REP	48000	4,60E+07	NA	3,7E+10	NA

Таблица 49: сводные данные по экспансии общей популяции TIL (экстраполированные на полный масштаб) для H3032, M1137 и H3034

Условие	**REP1-День 0**	**REP1-День 7**	**REP1-день 11 (кратность экспансии)**	**REP2-день17**	**REP2-день22**
Общая популяция TIL H3032	84700	NA	1,61E+08 (1905)	NA	7,78E+10
Общая популяция TIL M1137	140000	NA	3,84E+08 (2752)	NA	6,89E+10
Общая популяция TIL H3034	37600	NA	4,16E+07 (1105)	NA	5,21E+10

NA - не применимо

Таблица 50: сводные данные в отношении уровней метаболитов в отработанной среде

Опухоль	**Метаболиты**	**Исходный уровень (CM4)**	**Исследование**	**Gen 2 PD-1(+)**	**Gen 2 PD-1(-)**	**Общая популяция TIL**	**17-дневный ER**
L4093	**Глюкоза (г/л)**	3,01	0,11	0,98	1,11	0,97	0,95
M1135			0,14	1,21	1,26	1,04	1,06
H3032			---	1,44	---	1,3	---
M1137			---	1,48	---	1,46	---
H3034			---	1,35	---	1,78	---
L4093	**Лактат (г/л)**	0	1,5	1,72	1,6	1,72	1,78
M1135			1,67	1,49	1,5	1,66	1,67
H3032			---	1,27	---	1,39	---
M1137			---	1,28	---	1,26	---
H3034			---	1,4	---	1,07	---

L4093	**Аммиак (ммоль/л)**	0,57	2,96	2,12	2,13	2,18	2,47
M1135			2,95	2,06	2,06	2,22	2,31
H3032			---	2,19	---	2,29	---
M1137			---	2,24	---	2,22	---
H3034			---	1,95	---	1,62	---
L4093	**Глутамин (ммоль/л)**	1,83	0,03	1,84	1,84	1,84	1,45
M1135			0,03	2,01	2,04	1,79	1,66
H3032			---	1,96	---	1,85	---
M1137			---	2,01	---	1,89	---
H3034			---	2,09	---	0,67	---
L4093	**Glutamax (ммоль/л)**	4,11	0,01	1,99	1,98	1,98	1,56
M1135			0,02	2,18	2,21	1,95	1,79
H3032			---	2,12	---	2	---
M1137			---	2,15	---	2,02	---
H3034			---	2,25	---	0,71	---
L4093	**Холестерин (г/л)**	0,02	0,17	0,02	0,02	0,02	0,03
M1135			0,15	0,02	0,02	0,02	0,03
H3032			---	0,02	---	0,02	---
M1137			---	0,02	---	0,02	---
H3034			---	0,02	---	0,02	---

Таблица 51

Материалы/Реагенты/Оборудование	Идентификационные № образцов									
	L4093		M1135		H3032		M1137		H3034	
	№ партии/ инвентарный №/ Не применимо (N/A)	Срок годности/ Не применимо (N/A)	№ партии/ инвентарный №/ Не применимо (N/A)	Срок годности/ Не применимо (N/A)	№ партии/ инвентарный №/ Не применимо (N/A)	Срок годности/ Не применимо (N/A)	№ партии/ инвентарный №/ Не применимо (N/A)	Срок годности/ Не применимо (N/A)	№ партии/ инвентарный №/ Не применимо (N/A)	Срок годности/ Не применимо (N/A)
Антитело к CD3	B2499555	31.10.2024	B2499555	31.10.2024	B2499555	31.10.2024	B2499555	31.10.2024	B2499555	31.10.2024
Антитело к IgG4	10817T998B	Октябрь 2019	10817T998B	Октябрь 2019	10817T998B	Октябрь 2019	10817T998B	Октябрь 2019	10817T998B	Октябрь 2019
Антитело к PD1	B252643	31.12.2022	B252643	31.12.2022	B252643	31.12.2022	B252643	31.12.2022	B252643	31.12.2022
ДНКаза 1	35999731	Январь 2020	35999731	Январь 2020	35999731	Январь 2020	35999731	Январь 2020	35999731	Январь 2020
Коллагеназа	10000015	28.02.2023	10000015	28.02.2023	10000015	28.02.2023	10000015	28.02.2023	10000015	28.02.2023

Нейтральная протеаза	10020005	31.12.2020	10020005	31.12.2020	10020005	31.12.2020	10020005	31.12.2020	10020005	31.12.2020
Пробирки C Tube	5180621392	28.06.2021	5180621392	28.06.2021	5180621392	28.06.2021	5180621392	28.06.2021	5180621392	28.06.2021
Octo Dissociator с нагревателем	1573	n/a	1573	n/a	1573	n/a	1573	n/a	1573	n/a
Клеточное сито	154246	n/a	154246	n/a	154246	n/a	154246	n/a	154246	n/a
Гранулы автоматической настройки	T1804148	11.04.2019	T1804148	11.04.2019	T1804148	11.04.2019	T1804148	11.04.2019	T1804148	11.04.2019
Пакеты с PBS-EDTA	5180904466	14.08.2021	5180904466	14.08.2021	5180904466	14.08.2021	5180904466	14.08.2021	5180904466	14.08.2021

Линия отбора проб PEEK	*	n/a	*	n/a	PKSLR1S-000555	n/a	PKSLR1S-000538	n/a	PKSLR1S-001286	n/a
Интродьюсер	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Чип для сортировки	T1810151	09.10.2019	T1810151	09.10.2019	T1810151	09.10.2019	T1810151	09.10.2019	T1810151	09.10.2019
BSC	126112	n/a	126112	n/a	126112	n/a	126112	n/a	126112	n/a
Sony FX500	500708	n/a	500708	n/a	500708	n/a	500708	n/a	500708	n/a

ПРИМЕР 10: ОТБОР И ЭКСПАНСИЯ $PD1^{HIGH}$ КЛЕТОК НЕПОСРЕДСТВЕННО EX VIVO: ПРОЦЕСС ДЛЯ УЛУЧШЕНИЯ ОПУХОЛЕРЕАКТИВНЫХ TIL ДЛЯ ACT-ТЕРАПИИ

ВВЕДЕНИЕ

[001686] Адоптивная Т-клеточная терапия аутологичными опухоль-инфильтрирующими лимфоцитами (TIL) продемонстрировала устойчивую частоту ответов в когорте пациентов с метастатической меланомой [1]. Продукты TIL, используемые для лечения, состоят из гетерогенных Т-клеток, которые распознают опухолеспецифические антигены, неоантигены, специфичные для пациента, вызванные мутациями, и антигены, не связанные с опухолью [2, 3]. Исследования показали, что неоантиген-специфические Т-клетки вносят значительный вклад в противоопухолевую активность TIL [4]. Ожидается, что стратегии, обогащающие TIL в отношении противоопухолевой реактивности, дадут более эффективные терапевтические продукты, особенно при эпителиальных видах рака, которые, как известно, содержит высокую долю фоновых Т-клеток [5]. Несколько исследований продемонстрировали, что экспрессия PD1 - маркера, часто связанного с истощением Т-клеток - на TIL является отличительным признаком аутологичных опухолереактивных Т-клеток [6, 7, 8]. В этом примере представлена разработка нового протокола, предназначенного для отбора $PD1^{high}$ клеток и обогащения продукта TIL аутологичными опухолереактивными Т-клетками.

ЦЕЛЬ

[001687] В данном примере представлен протокол для сортировки и экспансии $PD1^{high}$ TIL и определения характеристик полученного продукта.

ОБЛАСТЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

[001688] Данное исследование относится к экспансии отсортированных ex-vivo $PD1^{high}$ TIL из меланомы, рака легкого и рака головы и шеи с использованием протокола 2-REP. Подвергнутые экспансии TIL оценивают на предмет роста, жизнеспособности, фенотипа, функции (секреция IFNγ, мобилизация CD107a), уничтожения опухоли и противоопухолевой реактивности (X-CELLigence), а также репертуара TCRvβ (методом проточной цитометрии и РНК-секвенирования). Обзор протокола этого способа представлен на фиг. 131.

Материалы

Опухолевая ткань

[001689] Опухоли различных гистологий получены от UPMC, Moffitt, Biotheme и MT group.

[001690] Стандартные реагенты для выращивания TIL, которые включают: 24-луночные планшеты G-Rex и колбы 10 и 100M (Wilson Wolf, Миннесота, № по каталогу P/N 80192M; № 80040S; № P/N 80500); среду CM2; среду RPMI 1640 (Life Tech, Калифорния, № по каталогу 11875093); среду AIMV (Gibco, Массачусетс, № по каталогу 0870112-DK); глутамат (Gibco, Массачусетс, № по каталогу 30050-061); бета-меркаптоэтанол (Gibco, Массачусетс, № по каталогу 21985-023); сыворотку группы AB

человека (Gemini, Калифорния, № по каталогу 100-512); 0,5 мг/мл гентамицин (Gibco, Массачусетс, № по каталогу 15750-060); и GMP рекомбинантный IL-2 (Cell-Genix, Германия, № по каталогу 1020-1000).

[001691] Реагенты для анализа

[001692] Компенсационные гранулы для проточной цитометрии: набор Amine Reactive Compensation Bead Kit (ARC) (Life Technologies, Калифорния, № по каталогу A10346) и VersaComp Antibody Capture Kit (Beckman Coulter, Калифорния, № по каталогу B22804).

[001693] Антитела для проточной цитометрии (TIL1, TIL2 (панель TIL2 для окрашивания поверхностных антигенов TIL, v1 и v2), TIL3 и (CD107a (оценка функции TIL по мобилизации CD107a); набор ArC Amine Reactive Compensation Bead Kit (Fisher Scientific, Массачусетс, № по каталогу A10346); форбол-12-миристат-13-ацетат (PMA) (Sigma, Миссури, № по каталогу P1586); Corning Bio-Coat T-Cell Activation Plate anti-CD3 (Fisher Scientific, Массачусетс, № по каталогу NC9937781); Corning Bio-Coat T Cell Activation Control Plate anti-CD3 (Fisher Scientific, Массачусетс, № по каталогу NC1108453); R&D Systems Human IFNγ Quantikine Kit (R&D Systems, Миннесота, № по каталогу SIF50); раствор для удаления детрита (Miltenyi Biotec, Германия, № по каталогу 130-109-398); и R&D Systems Human IFNγ Quantikine Kit (R&D Systems, Миннесота, № по каталогу SIF50).

ПРОЦЕДУРА

Подготовка опухоли

[001694] Образцы свежерезецированных опухолей были получены от исследовательских альянсов (UPMC, Moffitt) и поставщиков тканей (Biotheme и MTG group). Опухоли отправляли срочной доставкой в HypoThermosol (Biolife Solutions, Вашингтон, № по каталогу 101104) (с антибиотиком).

[001695] Опухоль вынимали из первичной и вторичной упаковки, взвешивали флакон с опухолью и средой для транспортировки и записывали массу. Опухоль вынимали из флакона и повторно взвешивали флакон и среду для транспортировки. Рассчитывали массу опухоли (масса флакона+среда для транспортировки+опухоль) - (флакон+для транспортировки).

[001696] Фрагментировали всю опухоль на фрагменты размером примерно 4-6 мм^3 для гидролиза опухоли. Если опухоль достаточно большая, на Gen2 отправляют четыре фрагмента по 3 мм^3. Опухоль может быть гидролизована с использованием любого из описанных в настоящем документе протоколов.

Ферментный препарат для гидролиза опухолей (с использованием ДНКазы высокой чистоты, коллагеназы и гиалуронидазы)

[001697] Лиофилизированные ферменты восстанавливали в количестве стерильного HBSS, указанном для каждого из ферментов для гидролиза, указанных ниже. Эти ферменты готовили в 10-кратной концентрации. Несколько раз переливали пипеткой, а также вращали, чтобы обеспечить полное восстановление.

[001698] Разводили 1 г коллагеназы IV (Sigma, MO, C5138) в 10 мл HBSS (чтобы

приготовить исходный раствор на 100 мг/мл). Перемешивали, переливая пипеткой, для растворения. Если после восстановления препарат не растворился, помещали на баню с H_2O при 37°C на 5 минут. Отмеряли аликвоты во флаконы объемом 1 мл. Получали 10X рабочий исходный раствор коллагеназы на 100 мг/мл.

[001699] Готовили исходный раствор ДНКазы (Sigma, MO, D5025) (10000 МЕ/мл). Единицы ДНКазы для каждой партии были указаны в прилагаемой спецификации. Рассчитывали соответствующий объем HBSS для восстановления 100 мг исходного препарата лиофилизированной ДНКазы. Например, если исходный препарат ДНКазы составлял 2000 Ед/мг, общая ДНКаза в исходном препарате составляет 200000 МЕ (2000 МЕ/мг x 100 мг). Для разведения до рабочего исходного раствора на 10000 МЕ необходимо добавить 20 мл HBSS к 100 мг ДНКазы (200000 МЕ/20 мл=10000 Ед/мл). Отмеряли аликвоты во флаконы объемом 1 мл. Получали 10X рабочий исходный раствор ДНКазы на 10000 МЕ/мл.

[001700] Готовили исходный раствор гиалуронидазы на 10 мг/мл (Sigma, Миссури, H2126). Восстанавливали флакон на 500 мг с помощью 50 мл HBSS с получением исходного раствора на 10 мг/мл. Отмеряли аликвоты во флаконы объемом 1 мл. Получали 10X рабочий исходный раствор гиалуронидазы на 10 мг/мл.

[001701] Разводили исходные ферменты для гидролиза до 1-кратной концентрации (1X). Чтобы получить 1X рабочий раствор, добавляли 500 мкл каждой из коллагеназы, ДНКазы и гиалуронидазы на 3,5 мл HBSS. Добавляли коктейль для гидролиза непосредственно в C-tube.

Ферментный препарат для гидролиза опухолей (с использованием GMP коллагеназы и нейтральной протеазы)

[001702] Лиофилизированные ферменты восстанавливали в количестве стерильного HBSS, указанном для каждого из ферментов для гидролиза, указанных ниже. Несколько раз переливали пипеткой, а также вращали, чтобы обеспечить полное восстановление.

[001703] Восстанавливали коллагеназу AF-1 (Nordmark, Швеция, N0003554) в 10 мл стерильного HBSS. Лиофилизированный исходный препарат фермента имеет концентрацию 2892 PZ-Ед/флакон. Таким образом, после восстановления исходный препарат коллагеназы имел концентрацию 289,2 PZ-Ед/мл. Следует обратить внимание, что исходный раствор ферментов может измениться, поэтому необходимо проверять концентрацию лиофилизированного исходного препарата и соответствующим образом изменять окончательное количество фермента, добавляемого в коктейль для гидролиза.

[001704] Восстанавливали нейтральную протеазу (Nordmark, Швеция, N0003553) в 1 мл стерильного HBSS. Лиофилизированный исходный препарат фермента имел концентрацию 175 DMC-Ед/флакон. Таким образом, после восстановления исходный препарат нейтральной протеазы имел концентрацию 175 DMC-Ед/мл. Следует обратить внимание, что исходный раствор ферментов может измениться, поэтому необходимо проверять концентрацию лиофилизированного исходного препарата и соответствующим образом изменять окончательное количество фермента, добавляемого в коктейль для

гидролиза.

[001705] Восстанавливали ДНКазу I (Roche, Швейцария, 03724751) в 1 мл стерильного HBSS. Лиофилизированный исходный препарат фермента имел концентрацию 4K-Ед/флакон. Таким образом, после восстановления исходный препарат ДНКазы имел концентрацию 4K-Ед/флакон. Следует обратить внимание, что исходный раствор ферментов может измениться, поэтому необходимо проверять концентрацию лиофилизированного исходного препарата и соответствующим образом изменять окончательное количество фермента, добавляемого в коктейль для гидролиза.

[001706] Готовили рабочий коктейль для гидролиза в соответствии с GMP. Добавляли 10,2 мкл нейтральной протеазы (0,36 DMC-Ед/мл), 21,3 мкл коллагеназы AF-1 (1,2 PZ/мл) и 250 мкл ДНКазы I (200 Ед/мл) на 4,7 мл стерильного HBSS. Помещали коктейль для гидролиза непосредственно в C-tube.

Обработка опухолей и гидролиз

[001707] При использовании GentleMACS OctoDissociator фрагменты опухоли переносят в пробирку C-Tube от GentleMACS (C-tube) или коническую пробирку на 50 мл в 5 мл коктейля для гидролиза (в HBSS), указанного выше. Переносили 2-3 фрагмента (4-6 мм) в каждую C-tube.

[001708] Переносили каждую C-tube (Miltenyi Biotec, Германия, 130-096-334) в GentleMACS OctoDissociator (Miltenyi Biotec, Германия, 130-095-937). Использовали в соответствии с инструкциями производителя. Следует обратить внимание, что гистология каждой опухоли имеет рекомендованную программу для диссоциации опухоли. Выбирали подходящую программу для соответствующей гистологии опухоли. Диссоциация длилась примерно один час.

[001709] Если GentleMACS OctoDissociator не был доступен, использовали стандартный встряхиватель. Помещали 2-3 фрагмента опухоли в коническую пробирку на 50 мл (запечатанную парафильмом, чтобы избежать утечки) и закрепляли на встряхивателе. Помещали встряхиватель в инкубатор с увлажненной атмосферой при 37 °C, 5% CO_2 на постоянное вращение на 1-2 часа. В качестве альтернативы, фрагменты опухоли могли быть подвергнуты гидролизу при комнатной температуре в течение ночи, также при постоянном вращении.

[001710] После гидролиза извлекали C-tube из Octodissociator или встряхивателя. Присоединяли сито на 0,22 мкм к стерильной конической пробирке Falcon. С помощью пипетки пропускали все содержимое из C-tube/конической пробирки на 50 мл (5 мл) через сито на 0,22 мкм в коническую пробирку на 50 мл. Промывали C-tube/коническую трубку на 50 мл с помощью 10 мл HBSS и пропускали через сито. Использовали плоский конец поршня стерильного шприца, чтобы разделить оставшуюся не подвергшуюся гидролизу опухоль, пропуская ее через фильтр. Добавляли CM1 или HBSS до 50 мл и закрывали пробирку.

[001711] Осаждали образцы центрифугированием, 1500 об/мин, 5 мин при комнатной температуре (с ускорением и замедлением, равным 9).

[001712] Осторожно удаляли жидкость, ресуспендировали осадок в 5 мл CM1 для подсчета клеток и оценки жизнеспособности.

[001713] Откладывали гидролизат цельной опухоли для следующего: 1. Культура клеток (неотобранный контроль TIL) 2. Контроли FMO проточной цитометрии 3. Фенотипирование гидролизата цельной опухоли перед сортировкой 4. Замораживание для анализов противоопухолевой реактивности/уничтожения клеток. Количество отложенных клеток зависело от общего выхода гидролизата и гистологии опухоли.

Очистка гидролизата с помощью набора для удаления детрита

[001714] Детрит удаляли из опухолевого гидролизата с помощью раствора для удаления детрита (Miltenyi Biotec, Германия, № по каталогу 130-109-398) в соответствии с инструкциями производителя. Центрифугировали суспензию опухолевых клеток при 300Xg в течение 10 минут при 4°C и полностью аспирировали супернатант. Тщательно ресуспендировали суспензию клеток с соответствующим объемом холодного буфера в соответствии с таблицей ниже и переносили суспензию клеток в коническую пробирку на 15 мл. НЕ ВРАЩАЛИ НА ВОРТЕКСЕ.

Таблица 52: растворы

	Ресуспендирование (PBS)	Раствор для удаления детрита	Покрывающий раствор (PBS)
0,5-1 г ткани	6200 мкл	1800 мкл	4 мл
,> 0,5 г ткани	3100 мкл	900 мкл	4 мл

[001715] Добавляли соответствующий объем холодного раствора для удаления детрита и хорошо перемешивали, медленно набирая жидкость в пипетку и выливая 10-20 раз с помощью пипетки на 5 мл. Осторожно покрывали 4 мл холодного буфера. Наклоняли пробирку и очень медленно переливали пипеткой, чтобы убедиться, что фаза PBS/D-PBS покрывает суспензию клеток и фазы не смешиваются. Центрифугировали суспензию опухолевых клеток при 3000Xg в течение 10 минут при 4°C с полным ускорением и полной остановкой. Образовались три фазы. Полностью аспирировали две верхние фазы и отбросили их. Нижняя фаза содержала раствор для удаления детрита и клетки. Оставляли на дне по меньшей мере такой же объем, какой был добавлен с раствором для удаления детрита (т. е. если был добавлен 1 мл раствора, на дне пробирки оставляли по меньшей мере 1 мл). Доводили до 15 мл холодным буфером и переворачивали пробирку по меньшей мере три раза. НЕ ВРАЩАЛИ НА ВОРТЕКСЕ. Центрифугировали при 4°C и 1000Xg в течение 10 минут с полным ускорением и полной остановкой. Ресуспендировали клетки в HBSS или среде для подсчета клеток.

Окрашивание гидролизованной опухоли для анализа методом проточной цитометрии и сортировки клеток

[001716] Гидролизат опухоли окрашивали коктейлем, который включает окрашивание PD1-PE, анти-IgG4 Fc-PE (вторичное антитело к ниволумабу и пембролизумабу) и CD3-FITC в соответствии со следующим протоколом. После подсчета

клетки ресуспендировали в 10 мл HBSS.

[001717] Ресуспендировали осадок в буфере для FACS (1 X HBSS, 1 мМ EDTA, 2% фетальной бычьей сыворотки). Количество добавляемого к осадку буфера для FACS зависело от размера осадка. Объем окрашивания должен быть примерно в 3 раза больше размера осадка (на 300 мкл клеток объем буфера должен быть не менее 900 мкл).

[001718] Для добавления антител каждые 100 мкл объема были эквивалентны одному тесту (титрованное количество антител); т. е. если объем составлял 1 мл, требовалось 10-кратное количество титрованного антитела.

[001719] Добавляли 3 мкл анти-CD3-FITC (BD Biosciences, Нью-Джерси, № по каталогу 561807), 2,5 мкл анти-PD1-PE (Biolegend, Калифорния, № по каталогу 329906) на объем 100- мкл. Также добавляли анти-IgG4 Fc-PE в концентрации 1:500 (Southern Biotech, Алабама, № по каталогу 9200-09). Добавляли 1 мкл анти-IgG4 Fc-PE на каждые 500 мкл буфера для FACS.

[001720] Инкубировали клетки на льду в течение 30 минут. Защищали от света во время инкубации. Пару раз встряхивали во время инкубации. Ресуспендировали клетки в 20 мл буфера для FACS. Пропускали раствор через клеточное сито на 70 мкм в новую коническую пробирку на 50 мл. Центрифугировали, 400Xg, 5 мин при комнатной температуре (ускорение и замедление 9). Аспирировали. Ресуспендировали клетки в количестве до $10e^6$/мл ВСЕХ КЛЕТОК (живых+мертвых) в буфере для FACS. Минимальный объем составлял 300 мкл. Переносили в стерильные *полипропиленовые* пробирки для FACS или конические пробирки на 15 мл. 3 мл/пробирка для сортировки методом FACS. Подготавливали пробирки на 15 мл для сбора отсортированных популяций. Помещали в пробирки 2 мл буфера для FACS.

Подсчет клеток и жизнеспособность

[001721] Nexcelom Cellometer K2 (Nexcelom, Массачусетс) использовали для подсчета клеток и определения жизнеспособности.

Сортировка методом FACS (запуск FX500)

[001722] Включали прибор и запускали программное обеспечение сортировки клеток. Выполняли автоматическую калибровку.

[001723] Подготавливали пять стерильных конических пробирок на 15 мл с 10 мл стерильной деионизированной воды. Подготавливали пять стерильных пробирок для FACS на 5 мл с 4 мл стерильной деионизированной воды. Подготавливали пять стерильных конических пробирок на 15 мл с 12 мл 70% этанола. Подготавливали пять стерильных конических пробирок на 15 мл с 12 мл 10% гипохлорита натрия.

Сбор образцов

[001724] Убедились, что камеры для образцов и сбора находились при 5 °C, и что была выбрана иконка перемешивания образца. Выполняли действия в программном обеспечении по сбору образцов.

[001725] Поместили пробирку, содержащую контроль МНПК, на платформу для сбора образцов.

[001726] Выбрали сбор 100000 клеток для обоих раскрывающихся меню, показанных выше. Убедились, что клеточные популяции были гейтированы правильно. Гейты были устанавлены на высокий, средний (также называемый промежуточным) и низкий (также называемый отрицательным) уровень с использованием МНПК, контроля FMO и самого образца, чтобы различить эти три популяции. См. фиг. 132.

[001727] Могло потребоваться отрегулировать настройки BSC или FSC. Напряжения для других каналов не регулировали. Загрузили контрольную пробирку с PE FMO и прогнали образец. При необходимости регулировали гейт PD1. См. фиг. 133.

[001728] Когда гейты были признаны удовлетворительными, регистрировали как можно больше событий (или максимум 20000 событий CD3). Можно было установить давление образца на 10, чтобы ускорить сбор. Останавливали сбор и вынимали пробирку. На платформу для образцов загружали коническую пробирку на 15 мл со стерильным dH20, изготовленным ранее. Выбирали 10 для давления образца. Запускали программное обеспечение. Собирали образец за одну минуту. Повторяли до тех пор, пока в гейте CD3 не осталось событий. Вынимали пробирку с dH20 и отбрасывали. Проводили линию на пробирке, в которую осуществляли сбор клеток, с помощью перманентного маркера внизу мениска и в средней точке. Добавляли образец для сбора на погрузочную платформу. Примечание: всего необходимо было собрать четыре фракции - отрицательную, среднюю, высокую и CD3. Сначала собирали фракции PD-1. Затем в последнюю очередь собирали фракцию CD3.

[001729] Выбирали 4 для давления образца. Запускали программное обеспечение. Дожидались появления клеток на экране. Около 15 секунд. Когда были видны 3 фракции PD-1, нажимали Paused. Сначала собирали две нижние фракции из трех.

[001730] Открывали дверцу камеры для образцов и загружали в нее блок камеры для сбора на 15 мл. Загружали пробирки для сбора, содержащие буфер для сбора, в блок камеры. Несколько раз переворачивали закрытые пробирки, чтобы покрыть верх пробирки буфером для сбора. Постукивали пробирками по поверхности BSC, чтобы удалить излишки буфера с верхней части пробирки и крышки. Промаркировали две пробирки названием образца и как отрицательную, среднюю или высокую. Выбирали фракции с наименьшим процентом PD-1 клеток. Снимали крышки и помещали пробирки в блок камеры для образцов. Выбирали правильную правую/левую ориентацию, чтобы она соответствовала положениям пробирки. Продолжали сбор загруженного образца. Регулировали давление образца так, чтобы общее количество событий в секунду было ниже 5000. Регулировали давление образца так, чтобы эффективность сортировки составляла по меньшей мере 85%. Регистрировали 50000 событий CD3.

[001731] Останавливали сортировку, когда образец становился пустым примерно на 2/3. Вынимали собранный образец, содержащий наибольшее количество событий. Закрывали крышкой и клали на лед или при температуре 4 °C. Оставляли образец с меньшим количеством в камере для сбора, чтобы можно было собрать больше клеток во время сбора образца с наивысшим процентным содержанием PD-1. Маркировали пробирку

с собранным образцом и снимали крышку. Помещали пробирку в камеру для сбора. Выбирали соответствующую левую/правую ориентацию сбора при сортировке. Загружали пробирки для сбора. Нажимали пуск, запись и начинали сортировку. Когда образец становился пустым примерно на треть, сортировку прекращали. Извлекали собранные фракции. Повторно закрывали и клали на лед или при 4 °C, и помещали пробирку для сбора CD3 в левую часть держателя. Устанавливали левую сторону для CD3, а правую - для пустой сортировки. Продолжали сортировку, пока в пробирке не закончится образец. Не считали критичным, если пробирка была «сухой». Вынимали пробирку с образцом из камеры для образцов. Отбрасывали. Удаляли отсортированную фракцию из камеры для сбора. Закрывали пробирки и несколько раз осторожно переворачивали, чтобы капли, находящиеся в верхней части пробирки, попали в раствор. Осторожно постукивали пробирками по поверхности BSC, чтобы удалить излишки раствора с верхней части пробирки и крышки. Клали пробирки на лед. Проверяли процентную чистоту фракций PD1. Помещали коническую пробирку на 14 мл со стерильной dH2O в камеру для образцов. Промывали. Повторяли. Вынимали пробирку с dH2O и добавляли пробирку с положительной фракцией. Изменяли значение давления образца на 10. Регистрировали 75 положительных на CD3 событий. Сразу останавливали пробирку и вынимали ее из камеры для образцов. Повторяли для остальных образцов. Экспортировали данные и выключали прибор.

Инициация REP1

[001732] Условие, имевшее наименьшее количество клеток (PD1high, PD1int или PD1neg) использовали для определения количества клеток для инициации REP1. Процент CD3 клеток (определенный во время сортировки) использовали для расчета общего количества клеток в цельном гидролизате, которое было необходимо для инициации REP1, в условии неотобранных TIL, с тем же количеством CD3 клеток, что и образцы PD1high, PD1int или PD1neg. Общее количество клеток цельного гидролизата для инициации REP 1=Количество отсортированных клеток, инокулированных в REP1/% CD3 клеток.

[001733] Приблизительно 1000-100000 CD3+ клеток помещали в G-Rex10 с 7 мл или 40 мл CM2, соответственно (50% RPMI 1640+10% сыворотки человека, glutamax, гентамицин и 50% AimV), с 3000 МЕ/мл IL-2 на 11 дней. По меньшей мере в одной колбе G-Rex осуществляли инициацию для популяций, отсортированных по PD1high, PD1int и PD1neg, и неотобранных TIL. Антитело к CD3 (клон: OKT3) (30 нг/мл) и фидеры (соотношение 1:100 (TIL:фидеры)) добавляли в каждую колбу в начале культивирования.

[001734] Инкубировали клетки в планшетах/колбах в течение 11 дней, не меняя среду (REP1).

[001735] По завершении REP1 удаляли приблизительно 30 мл среды для G-Rex 10. Ресуспендировали клетки в оставшейся среде с помощью переливания пипеткой. Помещали клетки в коническую пробирку на 50 мл и центрифугировали при 1500 об/мин в течение 5 мин (ускорение и замедление 9).

[001736] Аспирировали среду и ресуспендировали клетки в 10-20 мл CM2 для

подсчета и оценки жизнеспособности.

Инициация REP2

[001737] Для инициации мини-REP2 1e5 клеток помещали в G-Rex 10 с 40 мл среды CM2 и 3000 МЕ/мл IL-2. Антитело к CD3 (клон: OKT3) (30 нг/мл) и фидеры (соотношение 1:100, TIL:фидеры) добавляли в начале культивирования.

[001738] Для «полномасштабных прогонов» 2e6-30e6 клеток подвергали экспансии в G-Rex 100M в 1 л среды CM2 и 3000 МЕ/мл IL-2. Антитело к CD3 (клон: OKT3) (30 нг/мл) и фидеры (соотношение 1:100, TIL:фидеры) добавляли в начале культивирования.

[001739] Смену среды (для мелкого масштаба) или смену среды+разделение (для «полномасштабных прогонов») проводили на день 5 REP2 (день 16 процесса). Объем в колбах уменьшали примерно до 10 мл (G-Rex 10) или 100 мл (G-Rex 100M) и доводили до 40 мл (G-Rex 10) или 1 л (G-Rex 100M) с помощью CM2 или AimV+3000 МЕ/мл IL-2. Для «полномасштабных прогонов» колбы разделяли 1:2.

[001740] На день 11 REP2 (или день 22 процесса) объем в колбах уменьшали, центрифугировали их при 1500 об/мин в течение 5 минут при комнатной температуре (ускорение и замедление 9).

[001741] Готовый продукт оценивали по количеству клеток, жизнеспособности, фенотипу (TIL1, (DIG1) и функции (IFNγ и CD107a). Для анализа репертуара Vβ 1e6-5e6 клеток осаждали и замораживали. РНК-секвенирование было проведено iRepertoire. Готовые продукты также оценивали на противоопухолевую реактивность в анализе совместного культивирования и оценивали на IFNγ. Размороженные гидролизаты цельных опухолей культивировали совместно с TIL и оценивали на противоопухолевую реактивность (по секреции IFNγ) и уничтожение опухолевых клеток (% цитолиза) с использованием системы xCELLigence (ACEA Biosciences, Калифорния).

РЕЗУЛЬТАТЫ

[001742] Клетки, отсортированные по PD1+, демонстрировали недостаток пролиферативной способности. Ожидаемый выход готового продукта составляет > или=1e9. Подвергнутые экспансии PD1high клетки также были олигоклональными по сравнению с PD1int, PD1neg и неотобранными TIL. Исходя из предположения, что PD1+/PD1high клетки с большей вероятностью были антигенспецифичными, PD1high клетки проявляли повышенную опухолеспецифическую способность к уничтожению по сравнению с их неотобранными аналогами TIL.

ЦИТИРУЕМЫЕ ИСТОЧНИКИ ДЛЯ ПРИМЕРА 10

1. Rosenberg, S.A., et al., *Durable complete responses in heavily pretreated patients with metastatic melanoma using T-cell transfer immunotherapy.* Clin Cancer Res, 2011. **17**(13): p. 4550-7.

2. Kvistborg, P., et al., *TIL therapy broadens the tumor-reactive CD8(+) T cell compartment in melanoma patients.* Oncoimmunology, 2012. **1**(4): p. 409-418.

3. Simoni, Y., et al., *Bystander CD8(+) T cells are abundant and phenotypically distinct in human tumour infiltrates.* Nature, 2018. **557**(7706): p. 575-579.

4. Schumacher, T.N. and R.D. Schreiber, *Neoantigens in cancer immunotherapy.* Science, 2015. **348**(6230): p. 69-74.

5. Turcotte, S., et al., *Phenotype and function of T cells infiltrating visceral metastases from gastrointestinal cancers and melanoma: implications for adoptive cell transfer therapy.* J Immunol, 2013. **191**(5): p. 2217-25.

6. Inozume, T., et al., *Selection of CD8+PD-1+ lymphocytes in fresh human melanomas enriches for tumor-reactive T cells.* J Immunother, 2010. **33**(9): p. 956-64.

7. Gros, A., et al., *PD-1 identifies the patient-specific CD8(+) tumor-reactive repertoire infiltrating human tumors.* J Clin Invest, 2014. **124**(5): p. 2246-59.

8. Thommen, D.S., et al., *A transcriptionally and functionally distinct PD-1(+) CD8(+) T cell pool with predictive potential in non-small-cell lung cancer treated with PD-1 blockade.* Nat Med, 2018.

ПРИМЕР 11: Анализ репертуара TCR в PD1-отобранных TIL

ЦЕЛЬ

[001743] Определить поликлональность и разнообразие отобранных по белку программируемой клеточной смерти-1 (PD1) опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов (TIL), и сравнить их с неотобранными TIL.

ОБЛАСТЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

[001744] Семь пар аналогичных PD1-отобранных и неотобранных TIL, полученных из образцов плоскоклеточной карциномы головы и шеи человека (ПКГШ) и немелкоклеточного рака легкого (НМРЛ), анализировали на предмет их репертуара Т-клеточных рецепторов (TCR).

ИНФОРМАЦИЯ

[001745] Иммунотерапия рака задействует иммунную систему для распознавания и уничтожения опухолевых клеток. Успех, достигнутый с помощью ингибиторов иммунных контрольных точек (CPI), нацеленных на цитотоксический Т-лимфоцитарный антиген 4 и PD1, изменил лечение рака и сделал иммунотерапию одним из стандартных терапевтических подходов, наряду с хирургией, химиотерапией и лучевой терапией. CPI-терапия обеспечивает удивительно устойчивые клинические ответы, но только в подгруппе пациентов с некоторыми типами рака и часто за счет серьезных побочных действий [1, 2].

[001746] Адоптивная клеточная терапия (ACT) с использованием аутологичных опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов (TIL) стала мощным и потенциально излечивающим вариантом терапии нескольких видов рака (Geukes Foppen et al. Mol Oncol 2015). Продукты TIL, используемые для ACT, представляют собой неотобранные, не подвергшиеся генетическим манипуляциям препараты поликлональных Т-клеток, непосредственно выделенных из опухолевой ткани и массово подвергнутых экспансии *ex vivo* [3]. Этот процесс обеспечивает получение потенциально разнообразного репертуара опухолеспецифических Т-клеток памяти пациента без предварительной информации о природе или принадлежности антигенов [4]. В целом ACT является более простым, менее подверженным ошибкам, более безопасным и, вероятно, более эффективным подходом,

чем другие клеточные терапии, такие как химерный антигенный рецептор (CAR) и TCR Т-клетки, которые нацелены на один тканеспецифический или опухолеспецифический антиген и требуют введения трансгена. Тем не менее, существующий процесс TIL может также обеспечивать получение и экспансию различных фракций Т-клеток, которые не связаны с раком, так называемых фоновых TIL, которые распознают антигены, такие как антигены вируса Эпштейна-Барр (EBV), цитомегаловируса человека (CMV) или вируса гриппа [5].

[001747] Множество доказательств подтверждают распознавание неоантигена с последующим уничтожением опухолевых клеток в качестве основного механизма действия терапии TIL [6]. Обогащение TIL опухолевыми неоантиген-специфическими Т-клетками, при этом избегая отклонения, чтобы сохранить некоторый уровень разнообразия и избежать необходимости идентификации антигена, представляет собой привлекательный способ оптимизации продукта.

[001748] Было показано, что как индуцированный активацией модулятор Т-клеток, PD1 специфически экспрессируется в ответ на недавнюю встречу с антигеном и, в случае Т-клеток, инфильтрирующих раковые ткани, специфически маркирует неоантиген-специфические клетки [7, 8]. Таким образом, авторы реализовали подход, с помощью которого TIL отбирают по экспрессии PD1 перед экспансией *ex vivo*, чтобы достичь обогащения соответствующими TIL по сравнению с фоновыми TIL.

[001749] В данном примере Т-клеточный клональный состав отобранных по PD1 TIL сравнивали с составом аналогичных неотобранных TIL, чтобы убедиться, что в процессе отбора был получен продукт TIL, специфичный для пациента, с отличающимся составом и соответствующий субпопуляции неотобранной общей популяции TIL.

ДИЗАЙН ЭКСПЕРИМЕНТА

[001750] Клональный состав 7 пар аналогичных отобранных по PD1 и неотобранных TIL был установлен путем РНК-секвенирования *определяющей комплементарность области 3 (CDR3) вариабельной области бета-субъединицы TCR (vβ)*. Каждый клон Т-клеток в продукте TIL экспрессирует уникальный TCR, идентифицируемый по его *CDR3vβ*. Таким образом, уникальные последовательности CDR3vβ обеспечивают клональную принадлежность, с помощью которой можно определить и изучить репертуар Т-клеток продукта TIL.

Материалы

[001751] Образцы опухолей и продукты TIL, использованные в этой работе, описаны в таблице 53.

Таблица 53. Описание PD1-отобранных и неотобранных TIL, использованных в исследовании

Идентификационный № образца	Гистология	Дата подготовки	REP1 Кратность экспансии	REP2 Кратность экспансии

H3035 PD1-отобранные TIL	ПКГШ	15.03.19	350	2166
H3035 неотобранные TIL			869	1385
H3039 PD1-отобранные TIL	ПКГШ	09.04.19	654	1082
H3039 неотобранные TIL			123	893
L4089 PD1-отобранные TIL	НМРЛ	22.03.19	1502	2106
L4089 неотобранные TIL			2821	1416
L4096 PD1-отобранные TIL	НМРЛ	04.04.19	582	788
L4096 неотобранные TIL			1749	919
L4097 PD1-отобранные TIL	НМРЛ	22.03.19	230	1982
L4097 неотобранные TIL			1147	2455
L4100 PD1-отобранные TIL	НМРЛ	26.03.19	536	997
L4100 неотобранные TIL			1498	900
L4106 PD1-отобранные TIL	НМРЛ	29.03.19	1179	1367
L4106 неотобранные TIL			4500	1912

[001752] PD1-отобранные TIL получали из 2 образцов ПКГШ и 5 образцов НМРЛ в соответствии с процедурой примера 10. Вкратце, биоптат цельной опухоли подвергали гидролизу с использованием смеси ДНКазы, гиалуронидазы и коллагеназы IV. Часть полученной суспензии отдельных клеток окрашивали на PD1 и сортировали на приборе FX500 (Sony, HQ, New York). Клетки, отсортированные по PD1, и неотобранный гидролизат цельной опухоли подвергали двум 11-дневным фазам быстрой экспансии (REP) для получения PD1-отобранных TIL и неотобранных TIL, соответственно. Продукты TIL хранили замороженными и размораживали перед использованием в описанных ниже процедурах.

Методы

Экстракция РНК

[001753] Тотальную РНК экстрагировали из 1-2e6 TIL с использованием набора RNeasy® Mini Kit в соответствии с протоколом производителя (QIAGEN, Джермантуан, Мэриленд).

РНК-секвенирование

[001754] CDR3vβ амплифицировали полуколичественным способом с использованием собственного метода iRepertoire, называемого arm-PCR (мультиплексная ПЦР с сохранением ампликона), с их анализом с помощью HTBIvc (iRepertoire, Хантсвилл, Алабама). Анализ с помощью HTBIvc представляет собой вложенный анализ мультиплексной ПЦР с обратной транскрипцией, который фиксирует реаранжировку VDJ из лейкоцитов, в частности, реаранжировку VDJ бета-цепи из Т-клеток. Полученные библиотеки, созданные из входной РНК, секвенировали с использованием платформ Illumina Next Generation Sequencing (NGS) (Illumina, Сан-Диего, Калифорния) при

стандартной глубине чтения приблизительно 1 миллион чтений на библиотеку. Окончательные данные охватывают вариабельную область гена от каркаса 3 до начала константного гена, как показано на фиг. 134. Участок CDR3 вариабельной области гена соответствует сайту реаранжировки «DJ» на геномном уровне. Платформа MiSeq компании Illumina использовалась для всех образцов. Все эксперименты проводились iRepertoire.

Анализ данных секвенирования

[001755] Предварительный анализ результатов секвенирования был выполнен iRepertoire с использованием конвейера для фильтрации ошибок секвенирования и амплификации и определения последовательностей CDR3vβ и их частот для каждого образца (iRepertoire, Хантсвилл, Алабама). Пользовательские сценарии, написанные на Python, использовались для нормирования данных и проведения дополнительных анализов уникальных профилей CDR3vβ, включая идентификацию перекрывающихся клонов CDR3.

[001756] Количество уникальных CDR3vβ определяли как количество уникальных пептидных CDR3 в образце. Частота каждого отдельного клонотипа рассчитывалась путем подсчета количества чтений секвенирования, содержащих уникальный клонотип, прошедших демультиплексирование и фильтры в библиотеке. Индекс разнообразия Шеннона (H) был рассчитан по формуле $H = -\sum_{j=1}^{S} p_j \ln p_j$, где S - общее количество клонов в сообществе (богатство), а p_i- доля S, состоящая из клонаi. Перекрытие между PD1-отобранными и неотобранными TIL из одного и того же образца опухоли определяли путем идентификации клонов, содержащихся в обоих образцах, и описывали двумя способами: процент общих клонов описывали путем деления количества общих клонов на количество общих уникальных клонов, указанных в каждом типе продукта; процент общей популяции TCR определяли путем нормирования частот между образцами и суммирования частот общих клонов для каждого продукта TIL.

Ожидаемые результаты

[001757] Ожидается, что сравнительный анализ репертуаров TCR пар аналогичных PD1-отобранных и неотобранных TIL покажет, что отобранные TIL представляют собой часть неотобранных TIL и являются олигоклональными. Ожидалось, что клоны TIL, общие для PD1-отобранных и неотобранных продуктов, будут отображать разные частоты в этих 2 продуктах, что отражает измененную динамику конкуренции.

ПОЛУЧЕННЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ

Количество и разнообразие уникальных CDR3vβ в PD1-отобранных и неотобранных TIL

[001758] *In vivo* TIL состоят из Т-клеток, которые не только специфичны к опухолеспецифическим антигенам (например, неоантигенам), но также распознают широкий спектр эпитопов, не связанных с раком (например, эпитопов EBV, CMV или вируса гриппа) [5]. Эти не связанные с раком или фоновые TIL могут перерастать опухолеспецифические клетки в течение длительного периода культивирования in vitro,

который необходим для генерирования достаточного количества Т-клеток для лечения пациента, и могут привести к получению продуктов TIL с низким содержанием опухолереактивных Т-клеток [9].

[001759] Чтобы проверить, позволяет ли сортировка PD1-экспрессирующих TIL перед экспансией *in vitro* получить продукт, содержащий репертуар Т-клеток, отличный от репертуара предварительно не отсортированных TIL, продукты обоих процессов сравнивали по их составу TCR. Секвенирование CDR3vβ проводили на 14 образцах, как описано в примере. Данные анализировали в соответствии с описанными методами для получения количества уникальных CDR3vβ и индексов разнообразия для каждого образца. Результаты показаны на фиг. 134 и в таблице 54.

[001760] Количество уникальных CDR3vβ варьировалось от 1027 до 2778 и от 648 до 1975 в PD1-отобранных и неотобранных TIL, соответственно (фиг. 134A). Никакой специфической картины для ПКГШ по сравнению с НМРЛ не отмечалось. 4 из 7 PD1-отобранных образцов демонстрировали менее уникальные клоны CDR3vβ, чем аналогичный им неотобранный образец, что указывает на тенденцию к более низкой поликлональности PD1-отобранных TIL по сравнению с неотобранными TIL, что потребует тестирования дополнительных образцов для подтверждения. Аналогично количествам уникальных клонов CDR3vβ, показатели, отражающие клональное разнообразие PD1-отобранных и неотобранных TIL, существенно не различались (фиг. 134B).

[001761] Олигоклональность PD1+ TIL *in vivo* была обнаружена для меланомы и НМРЛ и, как полагают, отражает избирательную экспансию неоантиген-специфических TIL в микроокружении опухоли [7, 8]. Эти результаты частично согласовывались с этими сообщениями, возможно, потому, что фаза экспансии, которой были подвергнуты TIL из этого исследования до секвенирования, привела к появлению клонов с низкой частотой, которые не могли быть обнаружены до экспансии. Ни одни из TIL, проанализированных в опубликованных отчетах, не были подвергнуты экспансии, поэтому клоны с наименьшей частотой, возможно, не были учтены. Потенциальное значение наблюдений в этом примере заключалось в том, что в TME может быть больше PD1+ или опухолеспецифических Т-клеток, чем предполагалось изначально. Относительно высокий процент (38,4% в среднем, диапазон от 21 до 78%) PD1+ TIL, обнаруженный в исходных 7 гидролизатах опухолей, согласуется с этой гипотезой (отчет SR-19-009-000). В качестве альтернативы, очевидная поликлональность PD1-отобранного продукта TIL может быть результатом амплификации загрязняющих PD1- TIL. Чистота сортировки составляла около 93% (данные исследований), и, учитывая начальное преимущество в пролиферации, несколько PD1- TIL могли пролиферировать до обнаружимых уровней во время экспансии [8, 10, 11]

[001762] Поскольку количества и частоты уникальных клонов CDR3vβ в PD1-отобранных и неотобранных TIL могли быть выровнены во время культивирования *in vitro*, авторы решили сравнить принадлежность клонотипов Т-клеток, которые составляли PD1-отобранные и неотобранные TIL.

Количество и процент перекрывающихся клонов Т-клеток между PD1-

отобранными и неотобранными TIL

[001763] Было показано, что в TME PD1 специфически идентифицирует распознающие опухолевый антиген TIL, которые представляет собой часть Т-клеток, инфильтрирующих ткань [7, 8]. Как отмечалось выше, широкий спектр Т-клеток, не связанных с раком, также может присутствовать в TME в любой отдельно взятый момент времени, для которых не ожидается недавно усиленной экспрессии PD1 и на отсеивание которых направлена наша стратегия сортировки по PD1. Таким образом, авторы хотели определить, какая фракция клонотипов TIL, присутствующих в не подвергнутом отбору продукте, составляла отобранный по PD1 продукт. Для этого степень клонального перекрытия между PD1-отобранными и неотобранными продуктами оценивали для каждой пары образцов TIL. Результаты, выраженные в виде количества, процента и доли перекрывающихся клонов, показаны в анализе.

[001764] В среднем 5,4% и 5,36% общих клонов uCDR3vβ, что составляет 26,9% и 26,23% от общего количества чтений CDR3vβ, были обнаружены в PD1-отобранных TIL и неотобранных TIL, соответственно (фиг. 2). Эти числа указывают на то, что репертуар PD1-отобранных клонов только частично перекрывается с репертуаром неотобранных клонов, и что существует значительная популяция клонотипов, идентифицированных в PD1-отобранных TIL, которые не были обнаружены в аналогичных неотобранных TIL. Поскольку как PD1-отобранные, так и неотобранные TIL первоначально происходили из одного и того же гидролизата опухоли, результаты анализа перекрытия показывают, что 1) значительная часть предположительно фоновых TIL не попала в PD1-отобранный продукт TIL, и 2) варьирующая часть TIL, вероятно, состоящая из опухолеспецифических клеток, была получена в PD1-отобранном продукте, которая была потеряна во время фазы экспансии неотобранных TIL. Фоновые TIL, присутствующие при инициировании культивирования, вероятно, были способны перерасти PD1+ TIL с низким уровнем пролиферации в пуле неотобранных клеток, в то время как этим же самым PD1+ TIL давали возможность нарасти при культивировании в отсутствие фоновых клеток в условиях отбора по PD1. Была отмечена существенная разница между двумя гистологиями, изученными в этом примере. В то время как доля общих клонотипов увеличивалась в PD1-отобранных продуктах по сравнению с неотобранными продуктами для всех 5 образцов НМРЛ, для 2 образцов ПКГШ наблюдалась противоположная картина. Кроме того, неотобранные препараты, соответствующие этим 2 образцам, состояли из относительно высоких долей общих TIL. Разница может быть несистематической, учитывая ограниченный размер выборки; она также может отражать различие в типах опухолевых антигенов, присутствующих в потенциально связанных с ВПЧ раках. В целом, полученные авторами результаты согласуются со значительным влиянием этапа отбора на состав продукта подвергнутых экспансии TIL и дают основания полагать, что полученные в результате PD1-отобранные TIL могут быть значительно обогащены опухолеспецифическими TIL, содержание которых в противном случае было бы снижено во время фазы экспансии. См. фиг. 135.

Сравнение частот лучших клонов PD1-отобранных TIL в PD1-отобранных и неотобранных продуктах

[001765] Результаты обеих предыдущих оценок указали на то, что PD1-экспрессирующие опухолеспецифические TIL восприимчивы к конкуренции со стороны не связанных с опухолью фоновых клонов Т-клеток, а также на преимущество выделения релевантных для опухоли TIL из пула. Для дальнейшей оценки дифференциальной представленности опухолеспецифических Т-клеток в PD1-отобранных и неотобранных TIL был определен рейтинг 10 самых часто встречающихся клонов PD1-отобранных TIL в неотобранных TIL. Результаты показаны на фиг. 136 и в таблице 56.

[001766] Во всех сопоставленных продуктах TIL большинство представленных на высоком уровне клонов PD1-отобранных TIL были либо слабо представлены, либо вообще не представлены в неотобранном продукте, что подтверждает значительное влияние этапа отбора на конечный состав подвергнутого экспансии продукта и вероятное обогащение опухолеспецифическими Т-клетками в PD1-отобранных TIL.

ВЫВОДЫ И РЕКОМЕНДАЦИИ

[001767] Количество уникальных последовательностей CDR3vβ и индексы разнообразия оцениваемых PD1-отобранных TIL были сопоставимы с аналогичными неотобранными TIL, что дает основания полагать, что поликлональный и высоко разнообразный продукт может быть подвергнут экспансии после сортировки по PD1.

[001768] Репертуар клонов PD1-отобранных TIL частично перекрывался с репертуаром неотобранных TIL, что указывает на то, что при использовании процесса отбора может быть получено большее количество опухолеспецифических TIL.

[001769] Встречающиеся с высокой частотой клоны PD1-отобранных TIL присутствовали при более низких частотах в продукте неотобранных TIL, дополнительно подтверждая обогащение опухолеспецифическими TIL в новом продукте.

[001770] В целом, это исследование показывает, что продукты TIL, полученные в результате экспансии PD1-отобранных TIL, отличались по своему составу от неотобранных TIL. Это различие, вероятно, отражает умеренную представленность опухолеспецифических TIL и разрастание фоновых TIL, которое происходит в отсутствие отбора по PD1.

ЦИТИРУЕМЫЕ ИСТОЧНИКИ ДЛЯ ПРИМЕРА 11

1. Sharma, P. and J.P. Allison, *The future of immune checkpoint therapy.* Science, 2015. **348**(6230): p. 56-61.

2. Michot, J.M., et al., *Immune-related adverse events with immune checkpoint blockade: a comprehensive review.* Eur J Cancer, 2016. **54**: p. 139-148.

3. Wardell, S., et al., *A Cryopreserved TIL Product, LN-144, Generated with an Abbreviated Method Suitable for High Throughput Commercial Manufacturing Exhibits Favorable Quality Attributes For Adoptive Cell Transfer.* Journal for ImmunoTherapy of Cancer, 2017. **5**((Suppl 2)).

4. Gontcharova, V., et al., *Persistence of cryopreserved tumor-infiltrating lymphocyte*

product lifileucel (LN-144) in C-144-01 study of advanced metastatic melanoma. Cancer Res, 2019. **79** ((13 Suppl)).

5. Simoni, Y., et al., *Bystander CD8(+) T cells are abundant and phenotypically distinct in human tumour infiltrates.* Nature, 2018. **557**(7706): p. 575-579.

6. Schumacher, T.N. and R.D. Schreiber, *Neoantigens in cancer immunotherapy.* Science, 2015. **348**(6230): p. 69-74.

7. Gros, A., et al., *PD-1 identifies the patient-specific CD8(+) tumor-reactive repertoire infiltrating human tumors.* J Clin Invest, 2014. **124**(5): p. 2246-59.

8. Thommen, D.S., et al., *A transcriptionally and functionally distinct PD-1(+) CD8(+) T cell pool with predictive potential in non-small-cell lung cancer treated with PD-1 blockade.* Nat Med, 2018. **24**(7): p. 994-1004.

9. Yossef, R., et al., *Enhanced detection of neoantigen-reactive T cells targeting unique and shared oncogenes for personalized cancer immunotherapy.* JCI Insight, 2018. **3**(19).

10. Zhang, Y., et al., *Programmed death-1 upregulation is correlated with dysfunction of tumor-infiltrating CD8+ T lymphocytes in human non-small cell lung cancer.* Cell Mol Immunol, 2010. **7**(5): p. 389-95.

11. Fernandez-Poma, S.M., et al., *Expansion of Tumor-Infiltrating CD8(+) T cells Expressing PD-1 Improves the Efficacy of Adoptive T-cell Therapy.* Cancer Res, 2017. **77**(13): p. 3672-3684.

Таблица 54: количество уникальных последовательностей CDR3 и индекс разнообразия Шеннона продуктов неотобранных и PD1-отобранных TIL.

	Количество uCDR3		Индекс разнообразия Шеннона	
Образец	Неотобранные TIL	PD1-отобранные TIL	Неотобранные TIL	PD1-отобранные TIL
H3035	648	1397	1,9	3,3
H3039	1975	2032	2,1	3,9
L4089	1917	1713	5,3	5,3
L4096	1747	2778	2,2	3,9
L4097	1668	1177	5,8	3,8
L4100	1389	1027	3,8	3,2
L4106	1624	1621	5,4	3,6

Таблица 55: клональное перекрытие между PD1-отобранными и неотобранными TIL

		Неотобранные TIL			PD1-отобранные TIL		
Образец	количество общих uCDR3	количество uCDR3	% общих клонов uCDR3	% общей популяции от всех TCR	количество uCDR3	% общих клонов uCDR3	% общей популяции от всех TCR
H3035	32	648	4,94	74,65	1397	2,29	1,18
H3039	91	1975	4,61	46,45	2032	4,48	3,47
L4089	90	1917	4,69	10,17	1713	5,25	24,46
L4096	108	1747	6,18	0,42	2778	3,89	38,27
L4097	91	1668	5,46	7,96	1177	7,73	58,05
L4100	98	1389	7,06	30,58	1027	9,54	43,91
L4106	75	1624	4,62	13,35	1621	4,63	18,94

Таблица 56: частота 10 наиболее часто обнаруживаемых клонов в продуктах PD1-отсортированных TIL в продуктах PD1-отсортированных и неотсортированных TIL.

Образец	Последовательность CDR3	Частота в PD1-отсортированных TIL	Частота в неотсортированных TIL
H3035	ASSQLPLIGTGDSPLH	39,33	0,00
	ASRPGVAGNTDTQY	18,13	0,00
	ASSPDVGADTQY	13,45	0,00
	ASRIGSWSNQPQH	6,12	0,00
	ASSQTSNEQY	5,27	0,00

	ASSLGHRDHTGELF	2,39	0,00
	ASSPSLSSSNQPQH	1,30	0,00
	ATASGGTNEKLF	1,28	0,00
	SAAKGSSGANVLT	0,96	0,00
	ASSTRGSYGYT	0,92	0,20
H3039	ASSPMTSSDTQY	37,32	0,00
	ASMRGLRTEAF	21,96	0,00
	ASSPQRGNQPQH	5,46	0,00
	ASSLVALPGSVYGYT	2,64	0,00
	ASSTRDPDRYGYT	1,93	0,00
	ASSSPKGLTDTQY	1,86	0,00
	SAKMTGTGLINQPQH	1,59	0,00
	ASSQAAHQPQH	1,55	0,00
	ASTTQRGGFGNEQF	1,41	0,00
	ASSLGQVYGYT	1,41	0,16
L4089	ASSHEQAFAYGYT	16,01	0,00
	ASSSRDLGETQY	10,60	0,00
	ASSQTSGRLDNEQF	9,19	0,28
	ATSDLRTSGRANEQF	5,01	0,16
	ASSFWENNSPLH	4,86	0,00
	ASRGTVNSPLH	4,78	0,00
	ASSFGGNRNQPQH	3,31	0,00
	ASSYQGNTEAF	2,67	0,01
	ASSSSGGITEAF	2,55	0,00
	SARDPGTYGYT	2,27	0,00
L4096	ATRRAARTGELF	38,05	0,10
	ASRAGRVADTQY	14,67	0,00
	ATSWGLRASSYNEQF	7,76	0,00
	SAISDRETQY	5,73	0,00
	ATTPLTSGANVLT	4,89	0,00
	ASSSRTTLNEQF	3,66	0,00
	ASSPSTDTQY	2,40	0,00
	SAREGGDYGYT	1,74	0,00
	ASSIRFSNEQF	1,42	0,00

	ASSFQFNNQPQH	1,33	0,00
L4097	ASSLDKRANYGYT	30,14	0,02
	ASSLGGNGNQPQH	15,12	0,00
	SASPLVSGGGSYNEQF	9,73	0,56
	ASKIATGPNQPQH	8,86	0,00
	SASLAGALTDTQY	7,00	0,00
	ASSPEGGPNQPQH	6,78	0,00
	ASGKITGVSNYGYT	4,84	0,85
	ASSFGGWGTDTQY	2,21	0,00
	ASGHIGLAEAF	1,63	1,82
	ASSRSGTGSNQPQH	1,00	0,00
L4100	ASSPRGNTEAF	34,73	0,00
	SARDSTQSPQH	25,00	0,00
	SARDPGQGTSGNTIY	13,12	0,00
	ASSWDTDTQY	4,29	0,00
	ATSIPTGGSVKETQY	3,36	0,00
	ATSNPDRFFYNEQF	2,44	0,01
	ATRNLSTQY	2,12	0,33
	ASSPGQWVTEEQY	1,80	0,00
	ASDALGGPVTGANVLT	1,45	0,02
	ASSVGQVSNQPQH	1,17	0,00
L4106	ASKRSFRANQPQH	38,16	0,00
	ASSSGQAYSYEQY	21,79	0,00
	ASSSRSSGYTDTQY	6,43	0,00
	ASSYSAGTNYEQY	5,05	0,00
	ASSRSGENYNEQF	4,22	1,02
	ASRGGLSSGNTIY	3,60	0,82
	AGQDTNNEKLF	1,91	0,00
	ASNEGGGNTEAF	1,84	0,00
	SALNIGGYEQY	1,05	0,09
	ASSQDGQGVEDYGYT	0,91	0,00

ПРИМЕР 12: ЭКСПРЕССИРУЮЩИЕ PD1 КЛЕТКИ В ГИДРОЛИЗАТАХ ОПУХОЛЕЙ

ЦЕЛЬ

[001771] В этом примере оценивалась экспрессия белка программируемой клеточной смерти-1 (PD1) в гидролизатах цельных опухолей.

ОБЛАСТЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

[001772] Гидролизаты цельных опухолей следующих гистологий были оценены на PD1: меланома, немелкоклеточный рак легкого (НМРЛ), плоскоклеточная карцинома головы и шеи (ПКГШ), карцинома яичника (ОС), трижды негативная карцинома молочной железы (TNBC), рак предстательной железы (PC) и колоректальный рак (CRC).

ИНФОРМАЦИЯ

[001773] PD1 представляет собой многоаспектный фенотипический маркер, связанный с активацией, антигенной специфичностью и истощением. Он быстро индуцируется после активации и сохраняется на клетках, подвергшихся действию антигена, в условиях хронических заболеваний, включая рак [1, 2]. Молекулярно PD1 является членом семейства CD28 регуляторных рецепторов клеточной поверхности и экспрессируется на хронически активированных Т-клетках, NKT-клетках, В-клетках и моноцитах [3-5]. Взаимодействие с его лигандами, PD-L1 и PD-L2, индуцирует сигнальные каскады, которые приводят к снижению активации, пролиферации, выживаемости Т-клеток и продукции ими цитокинов [6].

[001774] Несмотря на иммуноингибиторную роль PD1, присутствие PD1-экспрессирующих опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов (TIL) было связано с благоприятными клиническими исходами при ПКГШ и НМРЛ, что позволяет предположить, что эти TIL могут принимать участие в контроле прогрессирования опухоли [7] [8, 9].

[001775] Исследования на меланоме и НМРЛ показали, что большая часть опухолереактивных TIL содержалась в субпопуляции PD1+ Т-клеток [4, 8, 10].

[001776] Основываясь на представлении о том, что PD1+ TIL представляют собой неоантиген-/опухолеспецифические лимфоциты, Iovance разрабатывает новый продукт PD1-отобранных TIL, LN-145-S1, обогащенный PD1+ TIL, отсортированными непосредственно из гидролизатов цельных опухолей.

[001777] Хотя экспрессия PD1 необходима для ответа на терапию против PD1, экспрессия PD1 сама по себе не гарантирует ответ на терапию. Например, PD1 присутствует на TIL при ОС, и его экспрессия коррелирует с выживаемостью [11]. Однако недавнее клиническое исследование ОС продемонстрировало, что препарат против PDL1 авелумаб в сочетании с химиотерапией не увеличивал выживаемость без прогрессирования [12]. Это исследование, наряду с большим количеством пациентов, устойчивых к терапии против PD1, которые экспрессируют PD1+ в микроокружении опухоли, демонстрирует, что блокады оси PD1/PDL1 in vivo недостаточно для контроля большинства видов рака.

[001778] Адоптивная Т-клеточная терапия с использованием lifileucel

продемонстрировала замечательную эффективность у пациентов с меланомой, рефрактерных к препаратам против PD1, указывая на то, что процесс TIL вызывал экспансию популяции Т-клеток, которая не была активизирована блокадой PD1 in vivo [13].

[001779] Сортировка PD1+ TIL перед экспансией *ex vivo* может дополнительно улучшить степень ответа на терапию TIL во всех гистологиях PD1+ рака.

[001780] Целью настоящего примера было исследовать гистологию нескольких опухолей на наличие PD1+ TIL, чтобы подтвердить возможность нацеливания на них с помощью этих TIL в клинике.

ДИЗАЙН ЭКСПЕРИМЕНТА

[001781] Гидролизаты опухолей из нескольких гистологий опухолей оценивали на предмет экспрессии PD1 с помощью проточной цитометрии.

МАТЕРИАЛЫ

[001782] Гидролизаты опухолей, использованные в этом примере, описаны на фиг. 137.

МЕТОДЫ

Обработка опухолей

[001783] Образцы тканей массой от 0,2 до 1,5 г были частично подвергнуты диссекции на фрагменты размером 4-6 мм и подвергнуты гидролизу с получением суспензии отдельных клеток, состоящей из опухолевых, стромальных и иммунных клеток. Тройной ферментный коктейль, включающий ДНКазу (500 МЕ/мл), гиалуронидазу (1 мг/мл) и коллагеназу IV (10 нг/мл), использовали для гидролиза ткани в течение 1 часа при 37°C и осторожном перемешивании.

Окрашивание на PD1

[001784] Гидролизаты цельных опухолей окрашивали в соответствии с приведенной ниже таблицей. Клетки окрашивали в 100 мкл/1e6 клеток.

Таблица 57. Панель окрашивания на PD1 проточной цитометрии

Антитело/ Окрашивание	**Клон**	**Флуорохром**	**Производитель**	**Количество (мкл/1e6 клеток)**
7-AAD	N/A	N/A	BD Biosciences	20
CD3	UCHT1	FITC	BD Biosciences	3
CD4	OKT4	PE/Cy	BioLegend	1
PD1	EH12.2H7	PE	BioLegend	2,5

Отбор по PD1 и стратегия гейтирования

[001785] Окрашенные клетки помещали либо в сортировщик клеток FX500 (SONY, Нью-Йорк), либо в анализатор клеток ZE5 (BioRad, Калифорния) и анализировали на основе следующей стратегии гейтирования. Сначала отдельные клетки были идентифицированы на основе прямого и обратного или бокового светорассеяния. Затем живые клетки были гейтированы на основании отрицательной/низкой флуоресценции 7-AAD или голубой

флуоресценции live-dead. TIL идентифицировали с помощью CD3. Клетки PD1 идентифицировали с использованием нормальной донорской периферической крови (ND-PBL) в качестве контроля. Гейты для отбора по PD1 помещали выше исходного уровня экспрессии PD1 в ND-PBL.

[001786] Анализ данных выполняли с использованием программного обеспечения FlowJo v8.1 Software (FlowJo LLC, Орегон). Результаты наносили на график с помощью GraphPad v8.

[001787]

ОЖИДАЕМЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ

[001788] Ожидалось, что PD1 будет экспрессироваться в большинстве анализируемых гидролизатов опухолей. Предполагалось, что процентное содержание PD1 будет различным в пределах каждого подтипа опухоли и между различными гистологиями опухолей.

ПОЛУЧЕННЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ

Экспрессия PD1 в гидролизатах опухолей

Чтобы определить, какие гистологии были кандидатами на отбор по PD1, экспрессию PD1 оценивали в нескольких образцах опухолей из нескольких гистологий рака с использованием проточной цитометрии. В общей сложности 4 меланомы, 7 НМРЛ, 5 ПКГШ, 3 ОС, 5 TNBC, 2 РС и 8 CRC были протестированы в соответствии с процедурой TMP-18-015, сокращенно изложенной в разделе 5.2. CRC состояли как из микросателлитных стабильных (MSS) (n=6), так и из микросателлитных нестабильных (MSI) (n=2) опухолей. После гидролиза часть полученной суспензии отдельных клеток окрашивали на PD1, анализировали методом проточной цитометрии и, когда было доступно >5e6 клеток, сортировали для получения PD1+ клеток. Клетки, отсортированные по PD1, подвергали двум 11-дневным фазам быстрой экспансии (REP) для получения PD1-отобранных TIL. Идентификационный № опухоли, гистология и результат эксперимента представлены на фиг. 137. Результаты анализа методом проточной цитометрии представлены на фиг. 138.

[001789] Все проанализированные гидролизаты опухолей экспрессировали определенный процент PD1+ клеток в популяции CD3. % PD1 варьировал от 11% до 78%, в среднем составляя 35% для исследованных гистологий. Меланома (n=4) и РС (n=2) дали самые низкие средние значения для экспрессии PD1: 27% и 21%, соответственно. Средний процент экспрессии PD1 не коррелировал с наблюдаемыми показателями клинического ответа для этих гистологий. Гистологии, которые отвечают на блокаду анти-PD1, такие как меланома и НМРЛ, не имели более высокого уровня/экспрессии PD1, чем гистологии, которые не отвечают на блокаду анти-PD1 (т. е. ОС и РС).

[001790] Важно отметить, что продукт, отобранный по PD1, может быть получен после экспансии PD1+ клеток in vitro во всех случаях, когда может быть инициировано культивирование (фиг. 138). Следовательно, на основе экспрессии PD1 все проанализированные гистологии являются потенциальными кандидатами для отбора по

PD1.

ВЫВОДЫ

[001791] PD1 экспрессировался на клетках CD3 во всех проанализированных гидролизатах опухолей.

[001792] Наблюдалась значительная внутри- и межопухолевая вариабельность экспрессии PD1.

[001793] Экспрессия PD1 не коррелирует с гистологиями, которые продемонстрировали восприимчивость к терапии анти-PD1.

ЦИТИРУЕМЫЕ ИСТОЧНИКИ ДЛЯ ПРИМЕРА 12

1. Simon, S. and N. Labarriere, *PD-1 expression on tumor-specific T cells: Friend or foe for immunotherapy?* Oncoimmunology, 2017. **7**(1): p. e1364828.

2. Simon, S., et al., *PD-1 expression conditions T cell avidity within an antigen-specific repertoire.* Oncoimmunology, 2016. **5**(1): p. e1104448.

3. Ahmadzadeh, M., et al., *Tumor antigen-specific CD8 T cells infiltrating the tumor express high levels of PD-1 and are functionally impaired.* Blood, 2009. **114**(8): p. 1537-44.

4. Inozume, T., et al., *Selection of CD8+PD-1+ lymphocytes in fresh human melanomas enriches for tumor-reactive T cells.* J Immunother, 2010. **33**(9): p. 956-64.

5. Melssen, M.M., et al., *Formation and phenotypic characterization of CD49a, CD49b and CD103 expressing CD8 T cell populations in human metastatic melanoma.* Oncoimmunology, 2018. **7**(10): p. e1490855.

6. Lee, J., et al., *Reinvigorating Exhausted T Cells by Blockade of the PD-1 Pathway.* For Immunopathol Dis Therap, 2015. **6**(1-2): p. 7-17.

7. Badoual, C., et al., *PD-1-expressing tumor-infiltrating T cells are a favorable prognostic biomarker in HPV-associated head and neck cancer.* Cancer Res, 2013. **73**(1): p. 128-38.

8. Thommen, D.S., et al., *A transcriptionally and functionally distinct PD-1(+) CD8(+) T cell pool with predictive potential in non-small-cell lung cancer treated with PD-1 blockade.* Nat Med, 2018.

9. Kansy, B.A., et al., *PD-1 Status in CD8(+) T Cells Associates with Survival and Anti-PD-1 Therapeutic Outcomes in Head and Neck Cancer.* Cancer Res, 2017. **77**(22): p. 6353-6364.

10. Gros, A., et al., *PD-1 identifies the patient-specific CD8(+) tumor-reactive repertoire infiltrating human tumors.* J Clin Invest, 2014. **124**(5): p. 2246-59.

11. Webb, J.R., K. Milne, and B.H. Nelson, *PD-1 and CD103 Are Widely Coexpressed on Prognostically Favorable Intraepithelial CD8 T Cells in Human Ovarian Cancer.* Cancer Immunol Res, 2015. **3**(8): p. 926-35.

12. Columbus, G. *Avelumab Misses Primary Endpoints in Phase III Ovarian Cancer Trial.* 2018; доступно по ссылке: https://www.onclive.com/web-exclusives/avelumab-misses-primary-endpoints-in-phase-iii-ovarian-cancer-trial.

13. Sarniak, A. *A phase 2, multicenter study to assess the efficacy and safety of autologous tumor-infiltrating lymphocytes (LN-144) for the treatment of patients with metastatic melanoma.* 2018; доступно по ссылке:

https://ascopubs.org/doi/abs/10.1200/JCO.2018.36.15_suppl.TPS9595.

ПРИМЕР 13: ЭКСПАНСИЯ PD1-ОТОБРАННЫХ TIL

ЦЕЛЬ

[001794] В этом примере оценивалась экспансия отсортированных по белку программируемой клеточной смерти-1 (PD1) опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов (TIL) по сравнению с аналогичными неотобранными TIL.

ОБЛАСТЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

[001795] PD1-отобранные TIL и неотобранные TIL из меланомы (n=4), немелкоклеточного рака легкого (НМРЛ) (n=7) и плоскоклеточной карциномы головы и шеи (ПКГШ) (n=2) были подвергнуты экспансии с помощью двух циклов протокола быстрой экспансии (REP), разработанных Iovance. Отобранные и неотобранные TIL оценивали на предмет экспансии по завершении REP1 (Д11) и REP2 (Д22).

ИНФОРМАЦИЯ

[001796] PD1 является членом семейства CD28 и экспрессируется на хронически активированных Т-клетках, NKT-клетках, В-клетках и моноцитах [1, 2]. Экспрессия PD1 лучше всего охарактеризована в Т-клетках, где она индуцируется при стимуляции TCR [2, 3] и поддерживается на антигенспецифических клетках в условиях хронических заболеваний [4, 5].

[001797] При взаимодействии PD1 с его лигандами, PD-L1 и PD-L2, передача сигналов через PD1 приводит к ингибированию пролиферации, выживаемости Т-клеток и продукции ими цитокинов. Несколько исследований на моделях хронических заболеваний, включая ВИЧ, гепатит С и рак, продемонстрировали существенное снижение кратности экспансии PD1+ клеток по сравнению с PD1- TIL [1, 6, 7]. В модели множественной миеломы у мышей по сравнению с их PD1-аналогами PD1-отобранные TIL пролиферировали менее эффективно, о чем свидетельствует 10-кратное снижение степени экспансии.

[001798] Несмотря на сниженную пролиферативную способность PD1-отобранных TIL, PD1+ клетки, как было показано, пролиферируют in vitro в присутствии антитела к CD3 и аллогенных фидеров с IL-2 [5-7]. Более того, у мышей PD1+ TIL уничтожали аутологичную опухоль *in vitro* и вызывали противоопухолевый ответ in vivo [8].

[001799] PD1+-отсортированные TIL (PD1-отобранные) и TIL, полученные из гидролизатов цельных опухолей (неотобранные TIL), были подвергнуты экспансии с использованием двух последовательных 11-дневных REP. Были рассчитаны кратности экспансии TIL, чтобы определить, могут ли PD1-отобранные TIL претерпевать экспансию, и сравнить их с аналогичными неотобранными TIL. Кратности экспансии рассчитывали по завершении REP1 (Д11) и REP2 (Д22) на основании изначального количества высеянных CD3 и количества клеток при сборе.

ДИЗАЙН ЭКСПЕРИМЕНТА

[001800] PD1-отобранные и неотобранные TIL были подвергнуты экспансии в течение 22-дневного процесса, с двухэтапным процессом экспансии, который включает 11-

дневный этап активации с последующим 11-дневным REP. Кратность экспансии рассчитывали для оценки пролиферативной способности двух продуктов TIL.

МАТЕРИАЛЫ

[001801] Образцы опухолей и продукты TIL, использованные в этой работе, описаны на фиг. 139.

[001802] Продукты PD1-отобранных и неотобранных TIL были получены из 4 меланом, 7 НМРЛ и 2 ПКГШ в соответствии с примером 10. Вкратце, цельные биоптаты опухолей подвергали гидролизу с использованием смеси ДНКазы, гиалуронидазы и коллагеназы IV. Часть полученной суспензии отдельных клеток окрашивали на PD1 и сортировали на приборе FX500 (Sony, HQ, New York). Клетки, отсортированные по PD1, и неотобранный гидролизат цельной опухоли подвергали 22-дневному процессу экспансии для получения PD1-отобранных TIL и неотобранных TIL, соответственно.

МЕТОДЫ

Обработка опухолей

[001803] Образцы тканей массой от 0,2 до 1,5 г были частично подвергнуты диссекции на фрагменты размером 4-6 мм и подвергнуты гидролизу с получением суспензии отдельных клеток, состоящей из опухолевых, стромальных и иммунных клеток. Тройной ферментный коктейль, включающий ДНКазу (500 МЕ/мл), гиалуронидазу (1 мг/мл) и коллагеназу IV (10 нг/мл), использовали для гидролиза ткани в течение 1 часа при 37°C и осторожном перемешивании. Чтобы гарантировать фиксацию фенотипа in situ, клетки PD1 отбирали непосредственно после гидролиза [2].

Окрашивание на PD1

[001804] Гидролизаты цельных опухолей окрашивали в соответствии с приведенной ниже таблицей. Клетки окрашивали в 100 мкл/1e6 клеток.

Таблица 58. Панель окрашивания на PD1 проточной цитометрии

Антитело/ Окрашивание	**Клон**	**Флуорохром**	**Производитель**	**Количество (мкл/1e6 клеток)**
7-AAD	N/A	N/A	BD Biosciences	20
CD3	UCHT1	FITC	BD Biosciences	3
CD4	OKT4	PE/Cy	BioLegend	1
PD1	EH12.2H7	PE	BioLegend	2,5

Отбор по PD1 и стратегия гейтирования

[001805] Окрашенные клетки помещали в сортировщик клеток FX500 (SONY, Нью-Йорк) и анализировали на основе следующей стратегии гейтирования. Сначала отдельные клетки гейтировали на основе прямого и обратного светорассеяния, затем живые клетки на основе отрицательной или низкой флуоресценции 7-AAD, а затем экспрессии CD3 и PD1. Клетки PD1 идентифицировали с использованием нормальной донорской периферической крови (ND-PBL) в качестве контроля. Гейты для отбора по PD1 помещали выше базового

уровня экспрессии PD1 в ND-PBL.

Протокол быстрой экспансии PD1-отобранных TIL

[001806] PD1-отобранные и неотобранные TIL были подвергнуты экспансии с помощью двухэтапного процесса экспансии, который включал 11-дневный этап активации с последующим 11-дневным REP, в течение в общей сложности 22 дней. TIL подвергали экспансии с использованием OKT3 (30 нг/мл, Miltenyi Biotec) и аллогенных облученных мононуклеарных клеток периферической крови (соотношение TIL:фидер 1:100). Количество высеянных TIL варьировалось от 5000 до 100000 CD3+ и зависело от количества предварительно отсортированных клеток, инфильтрата CD3 и экспрессии PD1.

Расчет кратности экспансии TIL

[001807] В Д11 (сбор для активации) и Д22 (сбор REP) TIL собирали и подсчитывали с использованием счетчика клеток Cellometer K2 Fluorescent Viability Cell Counter (Nexcelom, Массачусетс). Кратность экспансии PD1-отобранных и неотобранных популяций рассчитывали на основании количества высеянных CD3 и количества собранных клеток (т. е. кратность экспансии при активации=количество клеток в Д11/количество клеток в Д0, и кратность экспансии в REP=количество клеток в Д22/количество высеянных в Д11). Количество высеянных клеток для этапа активации в случае неотобранных TIL было нормировано к количеству клеток CD3 в PD1-отобранной популяции в Д0. Данные наносили на график с помощью GraphPad Prism v8.

РЕЗУЛЬТАТЫ

[001808] PD1-отобранные TIL претерпевали экспансию в присутствии антитела к CD3 и фидеров, но в меньшей степени, чем аналогичные неотобранные TIL.

ПОЛУЧЕННЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ

Кратность экспансии в PD1-отобранных и неотобранных TIL

[001809] Принято считать, что клетки PD1+ нарушают продукцию цитокинов и снижают пролиферацию [3, 4]. Было показано, что блокада PD1 или его лиганда PD-L1 in situ частично устраняет пролиферативную дисфункцию в TIL [2, 9]. In vitro PD1+ клетки могут пролиферировать при стимуляции антителом к CD3 и аллогенными фидерами в присутствии IL2 [1], но не до степени PD1- TIL [8].

[001810] Чтобы определить, могут ли PD1-отобранные TIL пролиферировать in vitro и продуцировать терапевтически подходящие количества TIL для инфузии, PD1-отобранные и неотобранные TIL из 4 меланом, 7 НМРЛ и 2 ПКГШ были подвергнуты экспансии с использованием двухэтапного процесса с этапом 11-дневной активации, за которым следует 11-дневный REP, и была проведена оценка кратности экспансии.

[001811] PD1-отобранные TIL имели более низкий уровень экспансии по сравнению с неотобранными TIL на этапе активации. Средняя кратность экспансии на этапе активации составила 833 по сравнению с 2650 для неотобранных TIL. Интересно, что для этапа REP PD1-отобранные TIL преодолели изначальный недостаток пролиферации, проявившийся на этапе активации, поскольку кратность экспансии для PD1-отобранных TIL (1308) была аналогична неотобранным TIL (1418). Сниженная пролиферация на этапе активации EP1

наблюдалась как в меланоме, так и в НМРЛ, но не в ПКГШ. Однако количество проанализированных опухолей ПКГШ было низким (n=2). Более того, пролиферативная способность в REP для трех гистологий была схожей между популяциями TIL.

ВЫВОДЫ

[001812] PD1-отобранные TIL были успешно подвергнуты экспансии из опухолевых гидролизатов меланомы, НМРЛ и ПКГШ. См. фиг. 141.

[001813] PD1-отобранные TIL имели значительно меньшую экспансию в REP1 по сравнению с неотобранными TIL.

[001814] Снижение пролиферации в PD1-отобранных TIL не присутствовало во время REP2.

[001815] PD1-отобранные TIL, несмотря на то, что они были получены из прошедших сортировку гидролизатов, хорошо разрастались в пределах диапазона кратности экспансии в REP (54-28214) продукта lifileucel 2 поколения от компании Iovance.

[001816] Несмотря на снижение пролиферативной способности PD1-отобранных TIL во время REP1, 13/13 PD1-отобранных TIL, сгенерированных с использованием процесса 2-REP, преодолели пороговое значение lifileucel для инфузии (т. е. >1e9).

[001817] Поскольку PD1+ TIL обогащены опухоле-/неоантиген-специфическими клетками, они обязательно должны присутствовать в значительном количестве в готовом продукте [10, 11]. Более низкая пролиферативная способность PD1-отобранных TIL дает основания полагать, что они будут вытеснены в препарате из не прошедших отбор TIL, что еще больше подтверждает целесообразность проведения отбора перед экспансией.

ЦИТИРУЕМЫЕ ИСТОЧНИКИ ДЛЯ ПРИМЕРА 13

1. Ahmadzadeh, M., et al., *Tumor antigen-specific CD8 T cells infiltrating the tumor express high levels of PD-1 and are functionally impaired.* Blood, 2009. **114**(8): p. 1537-44.

2. Lee, J., et al., *Reinvigorating Exhausted T Cells by Blockade of the PD-1 Pathway.* For Immunopathol Dis Therap, 2015. **6**(1-2): p. 7-17.

3. Virgin, H.W., E.J. Wherry, and R. Ahmed, *Redefining chronic viral infection.* Cell, 2009. **138**(1): p. 30-50.

4. Simon, S. and N. Labarriere, *PD-1 expression on tumor-specific T cells: Friend or foe for immunotherapy?* Oncoimmunology, 2017. 7(1): p. e1364828.

5. Simon, S., et al., *PD-1 expression conditions T cell avidity within an antigen-specific repertoire.* Oncoimmunology, 2016. **5**(1): p. e1104448.

6. Boussiotis, V.A., P. Chatterjee, and L. Li, *Biochemical signaling of PD-1 on T cells and its functional implications.* Cancer J, 2014. **20**(4): p. 265-71.

7. Petrelli, A., et al., *PD-1+CD8+ T cells are clonally expanding effectors in human chronic inflammation.* J Clin Invest, 2018. **128**(10): p. 4669-4681.

8. Fernandez-Poma, S.M., et al., *Expansion of Tumor-Infiltrating CD8(+) T cells Expressing PD-1 Improves the Efficacy of Adoptive T-cell Therapy.* Cancer Res, 2017. 77(13): p. 3672-3684.

9. Tumeh, P.C., et al., *PD-1 blockade induces responses by inhibiting adaptive immune*

resistance. Nature, 2014. **515**(7528): p. 568-71.

10. Gros, A., et al., *PD-1 identifies the patient-specific CD8(+) tumor-reactive repertoire infiltrating human tumors.* J Clin Invest, 2014. **124**(5): p. 2246-59.

11. Thommen, D.S., et al., *A transcriptionally and functionally distinct PD-1(+) CD8(+) T cell pool with predictive potential in non-small-cell lung cancer treated with PD-1 blockade.* Nat Med, 2018.

ПРИМЕР 14: ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ОЦЕНКА PD1-ОТОБРАННЫХ TIL

ЦЕЛЬ

[001818] В этом примере оценивалась эффекторная функция подвергнутых экспансии отобранных по белку программируемой клеточной смерти-1 (PD1) TIL и сравнивалась с неотобранными TIL.

ОБЛАСТЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

[001819] PD1-отобранные TIL и неотобранные TIL из меланомы и немелкоклеточного рака легкого (НМРЛ) и плоскоклеточной карциномы головы и шеи (ПКГШ) были оценены на предмет секреции IFNγ, высвобождения гранзима B и мобилизации CD107a в ответ на неспецифическую стимуляцию.

ИНФОРМАЦИЯ

[001820] PD1 представляет собой многоаспектный фенотипический маркер, связанный с активацией, антигенной специфичностью и истощением. Он быстро индуцируется после активации и сохраняется на антиген-специфических клетках в условиях хронических заболеваний, включая рак [1, 2]. Молекулярно PD1 является членом семейства CD28 регуляторных рецепторов клеточной поверхности и экспрессируется на хронически активированных Т-клетках, NKT-клетках, В-клетках и моноцитах [3-5]. Взаимодействие с его лигандами, PD-L1 и PD-L2, индуцирует сигнальные каскады, которые приводят к снижению активации, пролиферации, выживаемости Т-клеток и продукции ими цитокинов [6].

[001821] Несмотря на иммуноингибиторную роль PD1, присутствие PD1-экспрессирующих TIL было связано с благоприятными клиническими исходами при ПКГШ [7], НМРЛ [8] и карциноме яичника [9]. При встрече с антигеном в микроокружении опухоли происходит повышающая регуляция PD1. Несколько исследований продемонстрировали, что неоантиген-/опухолереактивные TIL в основном входит в субпопуляцию PD1+ Т-клеток [3, 10]. Следовательно, ожидается, что отбор TIL по экспрессии PD1 обогатит продукт TIL опухоле-/неоантиген-специфическими Т-клетками.

[001822] Отобранные PD1+ TIL, выделенные из опухолевых поражений, оценивали на функциональность в ответ на неспецифические стимулы. Было показано, что некультивированные отсортированные PD1+ TIL характеризуются значительно сниженной продукцией IFNγ относительно своих PD1- аналогов [3, 8, 11]. Однако при культивировании in vitro эффекторная функция подвергнутых экспансии PD1+ TIL восстанавливалась [4, 8]

[001823] Продукт TIL был разработан для обогащения опухолеспецифическими Т-

клетками по экспрессии PD1 (PD1-отобранными). PD1-отобранные TIL и TIL, полученные из гидролизатов цельных опухолей (неотобранные TIL), были подвергнуты экспансии с использованием двухэтапного процесса с 11-дневным этапом активации и последующим 11-дневным протоколом быстрой экспансии (REP). Чтобы определить, проявляют ли полученные в результате подвергнутые экспансии PD1-отобранные TIL эффекторную функцию, TIL оценивали в серии функциональных анализов in vitro и сравнивали с аналогичными неотобранными TIL.

ДИЗАЙН ЭКСПЕРИМЕНТА

[001824] PD1-отобранные и неотобранные TIL были подвергнуты экспансии в течение 22-дневного процесса, с двухэтапным процессом с 11-дневным этапом активации с последующим 11-дневным REP. Готовые продукты TIL были оценены на предмет функциональности с точки зрения секреции IFNγ и гранзима B в ответ на неспецифический стимул.

МАТЕРИАЛЫ

[001825] Образцы опухолей и продукты TIL, использованные в этой работе, описаны на фиг. 14.

МЕТОДЫ

Обработка опухолей

[001826] Образцы тканей массой от 0,2 до 1,5 г были частично подвергнуты диссекции на фрагменты размером 4-6 мм и подвергнуты гидролизу с получением суспензии отдельных клеток, состоящей из опухолевых, стромальных и иммунных клеток. Тройной ферментный коктейль, включающий ДНКазу (500 МЕ/мл), гиалуронидазу (1 мг/мл) и коллагеназу IV (10 нг/мл), использовали для гидролиза ткани в течение 1 часа при 37°C и осторожном перемешивании. Чтобы гарантировать фиксацию фенотипа in situ, клетки PD1 отбирали непосредственно после гидролиза [2].

Окрашивание на PD1

[001827] Гидролизаты цельных опухолей окрашивали в соответствии с приведенной ниже таблицей. Клетки окрашивали в 100 мкл/1e6 клеток. Панель окрашивания на PD-1 проточной цитометрии представлена в таблице 58 в примере 13 выше.

Отбор по PD1 и экспансия

[001828] PD1+ клетки отбирали с использованием прибора FX500 (SONY, Нью-Йорк). PD1-отобранные и неотобранные TIL были подвергнуты экспансии с использованием двухэтапного процесса с 11-дневным этапом активации, с последующим 11-дневным REP. TIL подвергали экспансии с использованием OKT3 (30 нг/мл, Miltenyi Biotec) и аллогенных облученных мононуклеарных клеток периферической крови (соотношение TIL:фидер 1:100).

Секреция IFNγ и гранзима B

[001829] TIL высевали из расчета 5e5 клеток/лунку в 1 мл 48-луночного планшета+300 МЕ/мл IL2 (CellGenix, Нью-Джерси). TIL стимулировали +/- 100 мкл/лунку гранул αCD3/αCD28/α41BB (ThermoFisher Scientific, Массачусетс) в течение 12-18 часов.

Супернатанты собирали и оценивали на предмет IFNγ (R&D Systems, Миннесота) и гранзима B (Life Technologies, Калифорния) с помощью ELISA. Планшеты для ELISA считывали на считывающем устройстве для микропланшетов BioTek (BioTek, Вермонт) и оценивали с помощью программного обеспечения для анализа данных Gen5. Данные наносили на график с помощью GraphPad Prism v8.

Мобилизация CD107

[001830] PD1-отобранные и неотобранные TIL стимулировали PMA/иономицином (BioLegend, Калифорния) в течение 2 часов в присутствии монензина (для предотвращения секреции белка). Затем TIL окрашивали красителем live/dead и антителами к CD3 и CD107a. Окрашенные клетки детектировали методом проточной цитометрии. Программное обеспечение FlowJo (Beckman Dickinson) использовали для анализа экспрессии CD107a в CD3+ клетках. Стратегия гейтирования была следующей: синглеты (FSC (прямое светорассеяние) и SSC (боковое светорассеяние)), живые клетки, CD3 и CD107. Все данные наносили на график с помощью GraphPad Prism v8.

Результаты

[001831] Подвергнутые экспансии PD1-отобранные TIL продуцировали IFNγ и гранзим B в ответ на неспецифическую стимуляцию.

Секреция IFNγ и гранзима B в PD1-отобранных и неотобранных TIL

[001832] Предыдущие отчеты продемонстрировали снижение или полную неспособность PD1+/PD1high клеток продуцировать IFNγ в ответ на PMA и иономицин [4] или стимуляцию антителом к CD3/антителом к CD28 [8, 11]. Эти исследования были проведены с некультивированными PD1+ TIL, которые в дополнение к PD1 также экспрессировали высокие уровни коингибирующих рецепторов LAG3 и Tim3 [8, 10, 12]. Из-за их «истощенного» фенотипа (т. е. высокой экспрессии ингибирующих рецепторов) и их неспособности производить эффекторные функции предварительно культивированные PD1+ считаются «дисфункциональными». Однако, как только PD1+/PD1high клетки претерпевают экспансию in vitro (с помощью антитела к CD3 и аллогенных фидеров), TIL восстанавливают свою способность продуцировать IFNγ [3, 4, 8]. Усиление эффекторной функции также было связано со значительным снижением экспрессии PD1 [3, 4, 8, 13]. Эти исследования дают основания полагать, что наблюдаемая анергия в некультивированных PD1+/PD1high TIL может быть обращена культивированием in vitro.

[001833] Чтобы оценить, были ли PD1+ TIL функциональными с точки зрения продукции цитокинов после экспансии, PD1-отобранные и аналогичные неотобранные TIL из 13 опухолей неспецифически стимулировали с помощью активирующих гранул αCD3/αCD28/α41BB, и оценивали на предмет секреции IFNγ и гранзима B.

[001834] PD1-отобранные TIL секретировали существенные уровни IFNγ и гранзима B в ответ на неспецифическую стимуляцию (гранулы αCD3/αCD28/αCD137), что дает основания полагать, что они действительно были функциональными после экспансии. См. фиг. 143.

[001835] Несмотря на их способность продуцировать IFNγ после экспансии, PD1-

отобранные TIL секретировали значительно меньше IFNγ по сравнению с неотобранными TIL. Следовательно, PD1-отобранные TIL имеют пониженную способность к продукции IFNγ в ответ на неспецифическую стимуляцию. Однако при совместном культивировании с аутологичной опухолью было показано, что PD1-отобранные TIL продуцируют значительно более высокие уровни IFNγ по сравнению с PD1- TIL [3, 8, 13]. Подвергнутые экспансии PD1-отобранные TIL и неотобранные TIL культивировали совместно с аутологичной опухолью и оценивали на IFNγ. PD1-отобранные TIL секретировали более высокие уровни IFNγ, чем неотобранные TIL, что демонстрирует не только их способность секретировать IFNγ, но также делать это опухолеспецифичным образом.

[001836] PD1-отобранные TIL продуцировали схожие, но несколько более высокие уровни гранзима B по сравнению с неотобранными TIL, что согласуется с предыдущими исследованиями в ПКГШ [11]. Поскольку гранзим B считается маркером активации, эти результаты дополнительно демонстрируют, что подвергнутые экспансии PD1-отобранные TIL не находятся в истощенном или анергическом состоянии после экспансии.

Мобилизация CD107a в PD1-отобранных TIL и неотобранных TIL при стимуляции PMA/иономицином

[001837] Экспрессия CD107a на клеточной поверхности считается надежным маркером эффекторной функции TIL. CD107a (LAMP1) мобилизуется на поверхность клетки при стимуляции и используется для измерения способности клетки к дегрануляции. Дегрануляция является условием для опосредованного перфорином-гранзимом уничтожения и необходима для немедленной литической функции, опосредованной отвечающими антигенспецифическими CD8+ Т-клетками [14, 15].

[001838] Для дальнейшей оценки функциональных возможностей PD1-отобранных TIL, 10 TIL после экспансии оценивали на мобилизацию CD107a и сравнивали с аналогичными неотобранными TIL.

[001839] Экспрессия CD107 была аналогичной в PD1-отобранных TIL по сравнению с неотобранными TIL. См. фиг. 144. Эти результаты дополнительно подтверждают представление о том, что PD1-отобранные TIL после экспансии являются высоко функциональными, и не свидетельствуют об истощении клеточной популяции.

ВЫВОДЫ

[001840] PD1-отобранные TIL продуцировали IFNγ и гранзим B, и мобилизовали CD107a в ответ на неспецифические стимулы.

[001841] В отличие от того, что было продемонстрировано для некультивированных PD1+/PD1high клеток, подвергнутые экспансии PD1-отобранные TIL являются в высокой степени активированными и функциональными и, следовательно, способны оказывать противоопухолевый эффект, находясь in vivo.

ЦИТИРУЕМЫЕ ИСТОЧНИКИ ДЛЯ ПРИМЕРА 14

1. Simon, S. and N. Labarriere, *PD-1 expression on tumor-specific T cells: Friend or foe for immunotherapy?* Oncoimmunology, 2017. 7(1): p. e1364828.

2. Simon, S., et al., *PD-1 expression conditions T cell avidity within an antigen-specific*

repertoire. Oncoimmunology, 2016. **5**(1): p. e1104448.

3. Inozume, T., et al., *Selection of CD8+PD-1+ lymphocytes in fresh human melanomas enriches for tumor-reactive T cells.* J Immunother, 2010. **33**(9): p. 956-64.

4. Ahmadzadeh, M., et al., *Tumor antigen-specific CD8 T cells infiltrating the tumor express high levels of PD-1 and are functionally impaired.* Blood, 2009. **114**(8): p. 1537-44.

5. Melssen, M.M., et al., *Formation and phenotypic characterization of CD49a, CD49b and CD103 expressing CD8 T cell populations in human metastatic melanoma.* Oncoimmunology, 2018. **7**(10): p. e1490855.

6. Lee, J., et al., *Reinvigorating Exhausted T Cells by Blockade of the PD-1 Pathway.* For Immunopathol Dis Therap, 2015. **6**(1-2): p. 7-17.

7. Badoual, C., et al., *PD-1-expressing tumor-infiltrating T cells are a favorable prognostic biomarker in HPV-associated head and neck cancer.* Cancer Res, 2013. **73**(1): p. 128-38.

8. Thommen, D.S., et al., *A transcriptionally and functionally distinct PD-1(+) CD8(+) T cell pool with predictive potential in non-small-cell lung cancer treated with PD-1 blockade.* Nat Med, 2018.

9. Webb, J.R., K. Milne, and B.H. Nelson, *PD-1 and CD103 Are Widely Coexpressed on Prognostically Favorable Intraepithelial CD8 T Cells in Human Ovarian Cancer.* Cancer Immunol Res, 2015. **3**(8): p. 926-35.

10. Gros, A., et al., *PD-1 identifies the patient-specific CD8(+) tumor-reactive repertoire infiltrating human tumors.* J Clin Invest, 2014. **124**(5): p. 2246-59.

11. Kansy, B.A., et al., *PD-1 Status in CD8(+) T Cells Associates with Survival and Anti-PD-1 Therapeutic Outcomes in Head and Neck Cancer.* Cancer Res, 2017. **77**(22): p. 6353-6364.

12. Jing, W., et al., *Adoptive cell therapy using PD-1(+) myeloma-reactive T cells eliminates established myeloma in mice.* J Immunother Cancer, 2017. **5**: p. 51.

13. Fernandez-Poma, S.M., et al., *Expansion of Tumor-Infiltrating CD8(+) T cells Expressing PD-1 Improves the Efficacy of Adoptive T-cell Therapy.* Cancer Res, 2017. **77**(13): p. 3672-3684.

14. Betts, M.R. and R.A. Koup, *Detection of T-cell degranulation: CD107a and b.* Methods Cell Biol, 2004. **75**: p. 497-512.

15. Rubio, V., et al., *Ex vivo identification, isolation and analysis of tumor-cytolytic T cells.* Nat Med, 2003. **9**(11): p. 1377-82.

ПРИМЕР 15: РЕАКТИВНОСТЬ ПРОТИВ АУТОЛОГИЧНОЙ ОПУХОЛИ В PD1-ОТОБРАННЫХ TIL

ЦЕЛЬ

[001842] В этом примере оценивалась реактивность/уничтожение против аутологичной опухоли подвергнутых экспансии отсортированных по белку программируемой клеточной смерти-1 (PD1) опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов (TIL) по сравнению с аналогичными неотобранными TIL.

ОБЛАСТЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

[001843] Тринадцать аналогичных PD1-отобранных TIL и неотобранных TIL из

меланомы, немелкоклеточного рака легкого (НМРЛ) и плоскоклеточной карциномы головы и шеи (ПКГШ) оценивали на реактивность и способность к уничтожению в ответ на стимуляцию аутологичной опухолью. Реактивность и цитотоксичность измеряли по секреции IFNγ и гибели опухолевых клеток (% цитотоксичности), соответственно.

ИНФОРМАЦИЯ

[001844] Адоптивная Т-клеточная терапия (АСТ) аутологичными опухоль-инфильтрирующими лимфоцитами (TIL) признана эффективным средством лечения метастатической меланомы и других солидных опухолей, вызывая устойчивые и полные ответы даже у пациентов, подвергшихся интенсивному предшествующему лечению [1-6]. В процессе туморогенеза злокачественные опухоли приобретают несинонимичные мутации, называемые неоантигенами [7, 8]. Недавние исследования подчеркнули важность опухолевых неоантигенов в распознавании опухолей и эффективных противоопухолевых Т-клеточных ответах in vivo [8, 9]. Присутствие опухолеспецифических Т-клеток было связано с регрессией опухоли и клинической эффективностью терапии TIL [10]. В частности, АСТ отобранными неоантиген-реактивными Т-клетками опосредует значимые объективные клинические регрессии у пациентов, имеющих рак ободочной кишки [8] и молочной железы [11].

[001845] До недавнего времени знания о репертуаре и частоте встречаемости опухолеспецифических TIL в опухолях были ограничены [12, 13]. Важнейшей целью АСТ является получение поликлонального продукта TIL, обогащенного опухолереактивными клонами Т-клеток. Недавние исследования продемонстрировали, что экспрессия PD1 в TIL может использоваться в качестве маркера и инструмента отбора для идентификации неоантиген-специфических лимфоцитов. PD1 экспрессируется при встрече с антигеном и повышающе регулируется на Т-клетках, которые ответили на опухолевые антигены и подверглись клональной экспансии в очаге опухоли [13-20].

[001846] Основываясь на представлении о том, что PD1+ TIL являются неоантиген-специфическими лимфоцитами, PD1+ TIL были оценены на предмет их способности распознавать аутологичные опухолевые линии ex vivo. Чтобы оценить противоопухолевую реактивность, TIL культивируют совместно с аутологичными линиями опухолевых клеток и анализируют на IFNγ. IFNγ является необходимым эффекторным цитокином в микроокружении опухоли (TME) и считается суррогатным маркером для идентификации антигенспецифических Т-клеток. Интересно, что PD1+ TIL секретировали более высокие уровни IFNγ по сравнению с их PD1- аналогами как при НМРЛ, так и при меланоме, при совместном культивировании с аутологичными гидролизатами [14, 17].

[001847] Лизис/уничтожение опухолевых клеток также использовался для идентификации антигенспецифических Т-клеток, однако эти анализы проводятся нечасто из-за сложностей с получением и поддержанием аутологичных жизнеспособных линий опухолевых клеток. В одном исследовании на меланоме было оценено уничтожение отсортированными PD1+ TIL, и оно показало, что PD1+ TIL обладают большей способностью лизировать аутологичные опухолевые линии по сравнению с PD1- TIL [13].

[001848] На основании данных, обсужденных выше, ожидается, что отбор TIL по экспрессии PD1 приведет к обогащению опухоле-/неоантиген-специфическими Т-клетками, которые демонстрируют более высокую аутологичную реактивность in vitro. Для отбора опухолеспецифических клеток PD1+ TIL были отсортированы из свежегидролизованных опухолей (PD1-отобранных) с использованием сортировки клеток с активированной флуоресценцией (FACS), перед экспансией. PD1-отобранные TIL и неотобранные TIL были подвергнуты экспансии с использованием двух последовательных 11-дневных REP.

[001849] Оценивали противоопухолевую реактивность и цитолиз, чтобы определить, обеспечит ли отбор по PD1+ обогащение антигенспецифическими Т-клетками. PD1-отобранные TIL культивировали совместно с аутологичными опухолевыми клетками и оценивали на предмет продукции IFNγ и гибели опухолевых клеток. Результаты сравнивали с препаратом аналогичных неотобранных TIL.

ДИЗАЙН ЭКСПЕРИМЕНТА

[001850] Совместные культуры TIL и аутологичной опухоли использовали для оценки уничтожения опухолевых клеток и противоопухолевой реактивности в 13 парах аналогичных PD1-отобранных и неотобранных TIL. Лизис опухоли и секрецию IFNγ использовали для измерения антигенной специфичности продуктов TIL.

МАТЕРИАЛЫ

[001851] Образцы опухолей и продукты TIL, использованные в этой работе, описаны на фиг. 145.

[001852] Продукты PD1-отобранных и неотобранных TIL были получены из 4 образцов меланомы, 7 ПКГШ и 2 НМРЛ в соответствии с процедурой TMP-18-015. Вкратце, цельные биоптаты опухолей подвергали гидролизу с использованием смеси ДНКазы, гиалуронидазы и коллагеназы IV. Часть полученной суспензии отдельных клеток окрашивали на PD1 и сортировали на приборе FX500 (Sony, HQ, New York). Оставшийся гидролизат замораживали и размораживали перед использованием для анализов, указанных ниже. Клетки, отсортированные по PD1, и неотобранный гидролизат цельной опухоли подвергали двум 11-дневным фазам быстрой экспансии (REP) для получения PD1-отобранных TIL и неотобранных TIL, соответственно.

МЕТОДЫ

Обработка опухолей и высевание

[001853] Аутологичные гидролизаты цельных опухолей обрабатывали с использованием набора для удаления мертвых клеток (Miltenyi, Германия). Высевали 1e5 живых клеток на лунку 96-луночного планшета и оставляли для прикрепления на 18 часов при 37°C в приборе xCELLigence (ACEA Biosciences Inc, Калифорния).

Подготовка совместной культуры

[001854] 1e5 аутологичных TIL, полученных из PD1-отобранных TIL и неотобранных TIL, добавляли в соответствующие лунки, в результате чего получали соотношение клеток 1:1 (TIL:мишень), и инкубировали в течение 48 часов.

Количественная оценка лизиса опухолевых клеток

[001855] Уничтожение аутологичных клеток-мишеней регистрировали как увеличение импеданса в результате отделения клеток. Уничтожение клеток (% цитолиза) рассчитывали по формуле % цитолиза = [1-(NCIst)/(СреднNCIRt)]x100, где NCIst - это нормированный клеточный индекс для образца, а NCIRt - это среднее значение нормированного клеточного индекса для соответствующих референсных лунок (только гидролизат). % Цитолиза рассчитывали с использованием программного обеспечения RTCA Software Pro (ACEA Biosciences Inc, Калифорния).

Секреция IFNγ

[001856] Супернатанты собирали через 24 часа после добавления TIL и оценивали на предмет высвобождения IFNγ с помощью ELISA (R&D systems). Планшеты для ELISA считывали на считывающем устройстве для микропланшетов BioTek (BioTek, Вермонт) и оценивали с помощью программного обеспечения для анализа данных Gen5. Данные наносили на график с помощью GraphPad Prism v8.

РЕЗУЛЬТАТЫ

[001857] В этом примере исследовали, обладают ли PD1-отобранные TIL большей способностью к уничтожению и способностью секретировать IFNγ, чем неотобранные TIL, при совместном культивировании с аутологичными гидролизатами опухоли.

ПОЛУЧЕННЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ

Противоопухолевая реактивность и уничтожение в PD1-отобранных TIL

[001858] Доклинические данные как на мышах, так и на людях продемонстрировали, что экспрессия PD1 на Т-клетках внутри опухоли может идентифицировать репертуар неоантиген-специфических лимфоцитов [13, 14, 17-20]. Несколько исследований продемонстрировали, что подвергнутые экспансии in vitro очищенные PD1+ TIL секретирует значительно большие количества IFNγ по сравнению с PD1- TIL при совместном культивировании с аутологичной опухолью [14, 17]. На основании этих исследований ожидается, что отбор TIL по экспрессии PD1 приведет к обогащению опухоле-/неоантиген-специфическими Т-клетками, что продемонстрировало бы более высокую аутологичную реактивность при оценке in vitro.

[001859] Тринадцать аналогичных PD1-отобранных TIL и неотобранных TIL были оценены на предмет реактивности и уничтожения против аутологичной опухоли. Лизис опухолевых клеток измеряли с использованием индекса опухолевых клеток. Клеточный индекс - это мера прикрепления клетки, рассчитанная на основе поверхностного импеданса клетки в лунке. По мере того, как опухолевые клетки прикрепляются, их импеданс увеличивается, как и клеточный индекс. Когда опухолевые клетки погибают и отделяются, клеточный индекс уменьшается из-за уменьшения импеданса. Следовательно, если TIL осуществляют лизис опухолевых клеток, клеточный индекс упадет, а рассчитанный процент цитолиза увеличится. Однако, если в любой момент совместного культивирования клеточный индекс упадет ниже нуля, цитолиз для этого образца не сможет быть рассчитан.

[001860] Из 13 оцененных опухолей только одна опухоль меланомы могла быть

оценена на цитолиз опухоли из-за низкой жизнеспособности опухолевых клеток и отсутствия прикрепления опухолевых клеток к планшету. Клеточный индекс и % цитолиза опухолевых клеток для оцениваемой меланомы показаны ниже на фиг. 146A и 146B, соответственно.

[001861] Супернатанты из анализа цитолиза в совместной культуре, описанного выше, анализировали на IFNγ. Из 13 оцененных опухолей секреция IFNγ была обнаружена в 3 меланомах и 2 НМРЛ (фиг. 146C).

[001862] Из-за технических трудностей % цитолиза опухоли оценивали только в 1/13 совместно культивированных опухолей. В подлежащей оценке опухоли с соответствующим неотобранным контролем TIL PD1-отобранные TIL продемонстрировали более высокую способность к уничтожению аутологичной опухоли, что определялось большим падением клеточного индекса (фиг. 1A) (что указывает на большее отделение клеток и гибель опухолевых клеток), а также более высокий процент цитолиза (фиг. 1B) по сравнению с неотобранными TIL. Эти результаты подтверждаются исследованием на меланоме, которое также продемонстрировало усиленный цитолиз в отобранной PD1+ субпопуляции с использованием альтернативного анализа с линиями аутологичных опухолевых клеток, а не с гидролизатами цельных опухолей [13]. Несмотря на небольшое количество оцениваемых опухолей, полученные авторами результаты в дополнение к другим продемонстрировали, что PD1-отобранные TIL обладают большей способностью уничтожать аутологичную опухоль, чем их неотобранные или PD1- аналоги.

[001863] Из 13 проанализированных совместно культивированных опухолей секреция IFNγ могла быть обнаружена в 5 опухолях. В 5/5 проанализированных опухолей PD1-отобранные TIL секретировали более высокие уровни IFNγ, чем неотобранные TIL, при совместном культивировании с аутологичным гидролизатом опухоли. Секреция IFNγ была опухолеспецифической, поскольку блокада анти-HLA-A, -B и -C снижала количество секретируемого IFNγ (фиг. 1C). Продукция более высоких уровней IFNγ в присутствии аутологичной опухоли дает основания полагать, что PD1-отобранные TIL имеет более высокую долю антигенспецифических TIL, чем неотобранные TIL.

ВЫВОДЫ

[001864] PD1-отобранные TIL продемонстрировали усиление гибели аутологичных опухолевых клеток по сравнению с неотобранными TIL.

[001865] Секреция IFNγ в ответ на аутологичную опухоль была значительно выше в PD1-отобранных TIL, чем в неотобранных TIL

[001866] Эти результаты демонстрируют, что по сравнению с неотобранными TIL PD1-отобранные TIL имеет лучшую реактивность против аутологичной опухоли in vitro.

[001867] Клиническая эффективность ACT напрямую связана с наличием опухолеспецифических TIL. Следовательно, обогащение опухолеспецифическими TIL посредством отбора по PD1 и экспансии может повысить способность TIL инициировать мощный и эффективный противоопухолевый эффект in vivo.

ЦИТИРУЕМЫЕ ИСТОЧНИКИ ДЛЯ ПРИМЕРА 15

1. Rosenberg, S.A., et al., *Durable complete responses in heavily pretreated patients with metastatic melanoma using T-cell transfer immunotherapy.* Clin Cancer Res, 2011. **17**(13): p. 4550-7.

2. Stevanovic, S., et al., *Complete regression of metastatic cervical cancer after treatment with human papillomavirus-targeted tumor-infiltrating T cells.* J Clin Oncol, 2015. **33**(14): p. 1543-50.

3. Stevanovic, S., et al., *A phase II study of tumor-infiltrating lymphocyte therapy for human papillomavirus-associated epithelial cancers.* Clin Cancer Res, 2018.

4. Andersen, R., et al., *Tumor infiltrating lymphocyte therapy for ovarian cancer and renal cell carcinoma.* Hum Vaccin Immunother, 2015. **11**(12): p. 2790-5.

5. Andersen, R., et al., *T-cell Responses in the Microenvironment of Primary Renal Cell Carcinoma-Implications for Adoptive Cell Therapy.* Cancer Immunol Res, 2018. **6**(2): p. 222-235.

6. Westergaard, M.C.W., et al., *Tumour-reactive T cell subsets in the microenvironment of ovarian cancer.* Br J Cancer, 2019.

7. Yossef, R., et al., *Enhanced detection of neoantigen-reactive T cells targeting unique and shared oncogenes for personalized cancer immunotherapy.* JCI Insight, 2018. **3**(19).

8. Tran, E., et al., *Cancer immunotherapy based on mutation-specific CD4+ T cells in a patient with epithelial cancer.* Science, 2014. **344**(6184): p. 641-5.

9. McGranahan, N., et al., *Clonal neoantigens elicit T cell immunoreactivity and sensitivity to immune checkpoint blockade.* Science, 2016. **351**(6280): p. 1463-9.

10. Schumacher, T.N. and R.D. Schreiber, *Neoantigens in cancer immunotherapy.* Science, 2015. **348**(6230): p. 69-74.

11. Zacharakis, N., et al., *Immune recognition of somatic mutations leading to complete durable regression in metastatic breast cancer.* Nat Med, 2018. **24**(6): p. 724-730.

12. Gros, A., et al., *Prospective identification of neoantigen-specific lymphocytes in the peripheral blood of melanoma patients.* Nat Med, 2016. **22**(4): p. 433-8.

13. Gros, A., et al., *PD-1 identifies the patient-specific CD8(+) tumor-reactive repertoire infiltrating human tumors.* J Clin Invest, 2014. **124**(5): p. 2246-59.

14. Inozume, T., et al., *Selection of CD8+PD-1+ lymphocytes in fresh human melanomas enriches for tumor-reactive T cells.* J Immunother, 2010. **33**(9): p. 956-64.

15. Simon, S. and N. Labarriere, *PD-1 expression on tumor-specific T cells: Friend or foe for immunotherapy?* Oncoimmunology, 2017. 7(1): p. e1364828.

16. Simon, S., et al., *PD-1 expression conditions T cell avidity within an antigen-specific repertoire.* Oncoimmunology, 2016. **5**(1): p. e1104448.

17. Thommen, D.S., et al., *A transcriptionally and functionally distinct PD-1(+) CD8(+) T cell pool with predictive potential in non-small-cell lung cancer treated with PD-1 blockade.* Nat Med, 2018.

18. Fernandez-Poma, S.M., et al., *Expansion of Tumor-Infiltrating CD8(+) T cells Expressing PD-1 Improves the Efficacy of Adoptive T-cell Therapy.* Cancer Res, 2017. 77(13): p. 3672-3684.

19. Jing, W., et al., *Adoptive cell therapy using PD-1(+) myeloma-reactive T cells eliminates established myeloma in mice.* J Immunother Cancer, 2017. **5**: p. 51.

20. Donia, M., et al., *PD-1(+) Polyfunctional T Cells Dominate the Periphery after Tumor-Infiltrating Lymphocyte Therapy for Cancer.* Clin Cancer Res, 2017. **23**(19): p. 5779-5788.

21. Simoni, Y., et al., *Bystander CD8(+) T cells are abundant and phenotypically distinct in human tumour infiltrates.* Nature, 2018. **557**(7706): p. 575-579.

ПРИМЕР 16: ОПРЕДЕЛЕНИЕ ФЕНОТИПИЧЕСКИХ ХАРАКТЕРИСТИК PD1-ОТОБРАННЫХ TIL

ЦЕЛЬ

[001868] Фенотипически охарактеризовать TIL, отобранные по белку программируемой клеточной смерти-1 (PD1).

ОБЛАСТЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

[001869] Этот пример включал определение характеристик PD1-отобранных TIL в отношении экспрессии маркеров клеточной поверхности, характерных для различных состояний Т-клеток, и сравнение их фенотипа с фенотипом аналогичных неотобранных TIL.

ИНФОРМАЦИЯ

[001870] Иммунотерапия рака задействует иммунную систему для распознавания и уничтожения опухолевых клеток. Успех, достигнутый с помощью ингибиторов иммунных контрольных точек (CPI), нацеленных на цитотоксический Т-лимфоцитарный антиген 4 и PD-1, изменил лечение рака и сделал иммунотерапию одним из стандартных терапевтических подходов, наряду с хирургией, химиотерапией и лучевой терапией. CPI-терапия обеспечивает удивительно устойчивые клинические ответы, но только в подгруппе пациентов с некоторыми типами рака и часто за счет серьезных побочных действий [1,2].

[001871] Адоптивная клеточная терапия (ACT) с использованием аутологичных опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов (TIL) стала мощным и потенциально излечивающим вариантом терапии нескольких видов рака [3]. Продукты TIL, используемые для ACT, представляют собой неотобранные, не подвергшиеся генетическим манипуляциям препараты поликлональных Т-клеток, непосредственно выделенных из опухолевой ткани и массово подвергнутых экспансии ex vivo [4]. Этот процесс обеспечивает восстановление потенциально разнообразного репертуара опухолеспецифических Т-клеток памяти пациента без предварительной информации о природе или принадлежности антигенов [5]. В целом ACT является более простым, менее подверженным ошибкам, более безопасным и, вероятно, более эффективным подходом, чем другие клеточные терапии, такие как химерный антигенный рецептор (CAR) и TCR Т-клетки, которые нацелены на один тканеспецифический или опухолеспецифический антиген и требуют введения трансгена. Тем не менее, существующие процессы TIL могут также обеспечивать восстановление и экспансию различных фракций Т-клеток, которые не связаны с раком, так называемых фоновых TIL, которые распознают антигены, такие как антигены вируса Эпштейна-Барр (EBV), цитомегаловируса человека (CMV) или вируса

гриппа [6].

[001872] Множество доказательств подтверждают распознавание неоантигена с последующим уничтожением опухолевых клеток в качестве основного механизма действия терапии TIL [7]. Обогащение TIL опухолевыми неоантиген-специфическими Т-клетками, при этом избегая отклонения, чтобы сохранить некоторый уровень разнообразия и избежать необходимости идентификации антигена, представляет собой привлекательный способ оптимизации продукта.

[001873] Было показано, что как индуцированный активацией модулятор Т-клеток, PD-1 специфически экспрессируется в ответ на недавнюю встречу с антигеном и, в случае Т-клеток, инфильтрирующих раковые ткани, специфически маркирует неоантиген-специфические клетки [8, 9]. Таким образом, авторы реализовали подход, с помощью которого TIL отбирают по экспрессии PD-1 перед экспансией ex vivo, чтобы достичь обогащения соответствующими TIL по сравнению с фоновыми TIL. Протокол включает сортировку PD-1+ TIL непосредственно из свежегидролизованных опухолей с использованием сортировки клеток с активированной флуоресценцией (FACS) и подвергание их двухэтапному процессу, который включает 11-дневный этап активации с последующим 11-дневным протоколом быстрой экспансии (REP), чтобы получить терапевтически подходящие количества PD-1-отобранных TIL.

[001874] В текущем исследовании PD-1-отобранные TIL были охарактеризованы фенотипически, чтобы убедиться, что 1) новый продукт соответствует спецификациям выпуска LN-145, и 2) сопоставим с неотобранным продуктом IL. PD-1-отобранные TIL оценивали с помощью проточной цитометрии на предмет экспрессии маркеров клеточной поверхности, связанных с линией, дифференцировкой, памятью, активацией, истощением и резидентной памятью.

ДИЗАЙН ЭКСПЕРИМЕНТА

[001875] PD1-отобранные и неотобранные TIL были подвергнуты экспансии в течение 22-дневного процесса, с двухэтапным процессом, который включает 11-дневный этап активации с последующим 11-дневным REP. Готовые продукты TIL были фенотипически охарактеризованы с использованием проточной цитометрии. Следует отметить, что продукты неотобранных TIL были получены из тех же гидролизатов цельных опухолей, что и PD1-отобранные TIL. Ограниченное количество опухолевой ткани препятствовало получению неотобранных контролей TIL из фрагментов опухоли, которые используются для получения продукта TIL LN-145 компании Iovance. Кроме того, чтобы подвергнуть экспансии небольшое количество отсортированной по PD-1 популяции, неотобранные TIL были подвергнуты процессу 2-REP, в отличие от pre-REP и только REP, которые используются для получения LN-145. Таким образом, хотя неотобранные TIL представляют собой истинный контроль для PD1-отобранных TIL, они не отражают TIL LN-145.

МАТЕРИАЛЫ

[001876] Образцы опухолей и продукты TIL, использованные в этой работе, описаны

на фиг. 147.

МЕТОДЫ

Отбор по PD1 и экспансия

[001877] Продукты PD1-отобранных и неотобранных TIL были получены из 4 меланом, 7 ПКГШ и 2 НМРЛ в соответствии с процедурой TMP-18-015. Вкратце, цельные биоптаты опухолей подвергали гидролизу с использованием смеси ДНКазы, гиалуронидазы и коллагеназы IV. Часть полученной суспензии отдельных клеток окрашивали на PD-1 и сортировали на приборе FX500 (Sony, HQ, New York). PD-1-отобранные и неотобранные TIL подвергали 11-дневному этапу активации с последующим 11-дневным REP в присутствии OKT3 (30 нг/мл, Miltenyi Biotec) и аллогенных облученных мононуклеарных клеток периферической крови (соотношение TIL:фидер 1:100).

Окрашивание антителами

[001878] TIL окрашивали маркером live/dead и на экспрессию CD3 и фенотипических маркеров, которые определяют линию, память, дифференцировку, активацию и истощение Т-клеток (фиг. 147). Две панели для проточной цитометрии, обозначенные 1 и 2, использовали для охвата представляющих интерес маркеров. Антитела и конъюгированные флуорофоры перечислены в таблице 59 ниже, где они упорядочены по фенотипическим параметрам. Цифры в скобках обозначают соответствующую панель.

Таблица 59: панели для фенотипирования для определения характеристик TIL

Линия	**Память**	**Дифференцировка**	**Активация**	**Истощение**	**Резидентная память**
CD3-BUV395 (1,2)	CD45RA-Alx700 (1)	CD27-PECF594 (1)	CD25-BV563 (2)	PD1-PE (2)	CD39-FITC (2)
CD4-PECy7 (1)	CCR7-PE (1)	CD28-BB515 (1)	CD69-APCR700 (2)	Lag3-PECy7 (2)	CD49a-BV711 (2)
CD8-BV786 (1)		CD56-BV737 (1)	CD134-BV650 (2)	Tim3-BV421 (2)	CD103-PV786 (2)
		CD57-PacBlue (1)	CD137-PerCP-Cy5.5 (2)	CD101-APC (2)	
		KLRG1-PEDazzle594 (2)			

FACS-анализ

[001879] Окрашенные клетки изучали на анализаторе клеток ZE5 (BioRad, Калифорния), следуя стандартным лабораторным процедурам. Вкратце, оцениваемые события были идентифицированы путем гейтирования отдельных клеток (с использованием параметров прямого и бокового светорассеяния), которые были живыми (отрицательные или низкие по красителю live/dead) и $CD3^+$. Индивидуальные фенотипические маркеры гейтировали на основе FMO (флуоресценция минус один) и контрольных мононуклеарных Т-клеток периферической крови от нормальных доноров.

[001880] Анализ данных выполняли с использованием программного обеспечения FlowJo v8.1 Software (FlowJo LLC, Орегон). Результаты наносили на график с помощью GraphPad v8.

Ожидаемые результаты

[001881] Ожидается, что PD-1-отобранные TIL будут сопоставимы с неотобранными TIL для большинства фенотипических маркеров и будет соответствовать фенотипическим критериям выпуска LN-145. На основании опубликованных отчетов ожидалось, что экспрессия PD-1 PD-1-отобранными TIL будет снижаться на протяжении этапа экспансии in vitro [10-12]. Остались ли уровни PD-1 PD-1-отобранных TIL выше, чем уровни неотобранных TIL, было неизвестно.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Экспрессия CD4 и CD8 в PD-1-отобранных TIL

[001882] PD-1 экспрессируется в CD3+ Т-клетках, но в основном был охарактеризован в CD8+ Т-клетках, несмотря на его экспрессию в обеих линиях CD4+ и CD8+ [10, 13]. Чтобы определить, изменила ли сортировка по PD-1+ соотношение клонов линий CD4+ и CD8+ Т-клеток в подвергнутых экспансии PD-1-отобранных TIL по сравнению с неотобранными TIL, 13 пар аналогичных образцов сравнивали в отношении экспрессии 2 маркеров. Результаты показаны на фиг. 148.

[001883] Средние проценты CD4+ и CD8+ клеток в подвергнутых экспансии TIL были аналогичными в PD-1-отобранных и неотобранных продуктах. Процент CD4+ Т-клеток был выше, чем CD8+ Т-клеток, в продуктах как PD-1-отобранных, так и неотобранных TIL.

[001884] Эти результаты дают основания полагать, что доли CD4+ и CD8+ TIL существенно не различались в популяции PD-1-отобранных Т-клеток по сравнению с продуктами неотобранных TIL. Эти результаты дают основания полагать, что отбор по PD-1 не влияет на линии Т-клеток готового подвергнутого экспансии продукта.

Маркеры молодости/дифференцировки в PD-1-отобранных TIL

[001885] Ответ на АСТ требует баланса эффекторных функций, типичных для дифференцированных Т-клеток, и персистенции, которая связана с молодостью Т-клеток и фенотипом центральной памяти [14, 15]. Принято считать, что высокая экспрессия CD27 и CD28 связана с молодостью Т-клеток, в то время как экспрессия CD56, CD57 и KLRG1 указывает на окончательно дифференцированные клетки. Тринадцать пар аналогичных

продуктов PD-1-отобранных и неотобранных TIL окрашивали на эти маркеры и анализировали с помощью проточной цитометрии. Результаты показаны на фиг. 149.

[001886] PD-1-отобранные и неотобранные TIL экспрессировали схожий фенотип дифференцировки, на что указывают низкие уровни CD27, CD56 и KLRG1 и умеренные уровни CD28 и CD57. Однако PD-1-отобранные TIL имели значительно более высокие уровни CD27 и пониженные уровни KLRG1 по сравнению с неотобранными TIL, что, вероятно, означает менее дифференцированный фенотип в PD-1-отобранных TIL. Эти результаты согласуются с сообщениями об отобранных PD-1high TIL из НМРЛ, в которых TIL были CD27+ и KLRG1- по сравнению с их PD-1- аналогами [2]. CD27+ TIL также были связаны с противоопухолевой активностью in vivo, а KLRG1+ T - со сниженной in vivo персистенцией Т-клеток [16]. Эти результаты дают основания полагать, что PD-1-отобранные TIL могут быть способны поддерживать устойчивую противоопухолевую активность, необходимую для устойчивых ответов in vivo [7].

Популяции Т-клеток памяти в PD-1-отобранных TIL

[001887] Субпопуляции Т-клеток памяти можно идентифицировать на основе дифференциальной экспрессии 2 маркеров клеточной поверхности: CD45RA и CCR7. Т-клетки эффекторной памяти (TEM) определены как CD45RA- и CCR7-, Т-клетки центральной памяти (TCM) - как CD45RA- и CCR7+, Т-клетки памяти стволовых клеток (TSCM) - как CD45RA+ и CCR7+, и CD45RA+ эффекторные Т-клетки памяти или терминально дифференцированные Т-клетки (TEMRA) - как CD45RA+ и CCR7- [17].

[001888] Опубликованные исследования показали, что PD-1+ TIL в основном состоят из Т-клеток эффекторной памяти (TEM) [11, 18]. Кроме того, было показано, что эти TEM составляют основную популяцию продуктов неотобранных TIL, которые продемонстрировали клиническую активность [19]. Для определения доли каждой субпопуляции Т-клеток памяти в PD-1-отобранных TIL 13 продуктов оценивали на предмет экспрессии CD45RA и CCR7 с помощью проточной цитометрии. Результаты показаны на фиг. 150.

[001889] Аналогично существующим продуктам TIL от компании Iovance, lifileucel и LN-145, как и другим продуктам TIL, продемонстрировавшим клиническую эффективность, как PD-1-отобранные TIL, так и неотобранные TIL преимущественно состояли из TEM [20]. Отбор по PD-1, по-видимому, не повлиял на репертуар памяти подвергнутых экспансии TIL.

Статус активации PD-1-отобранных TIL

[001890] После активации Т-клеток происходит повышающая регуляция нескольких маркеров клеточной поверхности, каждый на своей стадии процесса активации. Одним из маркеров самой ранней активации является CD69, который представляет собой индуцибельный гликопротеин клеточной поверхности, экспрессируемый при активации посредством TCR [21]. CD25, альфа-субъединица рецептора IL-2, активируется немного позже, чем CD69, и играет решающую роль в регуляции пролиферации Т-клеток [21]. Кроме того, костимулирующие рецепторы, такие как CD134 и CD137, также считаются

маркерами активации Т-клеток и часто используются для идентификации антигенспецифических Т-клеток в инфильтрирующих опухолях [21, 22].

[001891] На основании профиля экспрессии этих маркеров было показано, что TIL, прошедшие REP, демонстрируют активированный фенотип, согласующийся со способностью продуктов TIL инициировать мощный противоопухолевый Т-клеточный ответ после инфузии [3].

[001892] В обширных исследованиях был оценен статус активации PD-1+ и PD-1- TIL как у мышей, так и у людей. Данные на мышах показали, что PD-1+ TIL экспрессировали более высокий процент CD134 и CD137 по сравнению с PD-1- [11, 23]. Аналогичные результаты были получены в исследованиях на людях, в которых было обнаружено, что уровень CD137 выше в PD-1+/PD-1high TIL, у пациентов с меланомой и НМРЛ [8, 12].

[001893] В дополнительных исследованиях была оценена экспрессия CD69 и CD25 в PD-1+ TIL. Было показано, что значительная часть PD-1+ TIL коэкспрессирует CD69 [24], однако большая часть PD-1+ не экспрессирует CD25 [13].

[001894] Чтобы убедиться, что PD-1-отобранные TIL экспрессируют активированный фенотип после экспансии, 13 продуктов TIL анализировали на предмет экспрессии CD25, CD69, CD134 и CD137 с помощью проточной цитометрии и сравнивали с неотобранными TIL. Результаты показаны на фиг. 151.

[001895] Четыре маркера активации были обнаружены в среднем на 3,34-22,28% PD-1-отобранных TIL, что указывает на то, что часть TIL во всех протестированных продуктах экспрессировала по меньшей мере один маркер, свидетельствующий об активации. Процент CD25+, CD69+ и CD134+ был сопоставим с таковым в неотобранных TIL, что дает основания полагать, что этап отбора по PD-1 не повлиял на статус активации клеток, подвергнутых экспансии in vitro. Однако неотобранные TIL демонстрировали значительно более низкие уровни CD137+ Т-клеток, чем PD-1-отобранные TIL, что могло отражать несколько более высокий статус активации PD-1-отобранных TIL. В целом, эти результаты показывают, что REP равномерно активирует PD-1-отобранные и неотобранные TIL, и дают основания полагать, что PD-1+ TIL при культивировании in vitro экспрессируют активированный фенотип [10].

Маркеры истощения в PD-1-отобранных TIL

[001896] В обширных исследованиях была оценена коэкспрессия PD-1 с другими коингибирующими маркерами/маркерами истощения. Субпопуляция PD-1+ TIL стабильно коэкспрессировала TIM3, LAG3, TIGIT, BTLA и CTLA4 [8, 11, 12, 18, 23]. Однако эти маркеры были оценены в свежевыделенных PD-1+ TIL, в то время как об их статусе в случае подвергнутых экспансии PD-1+ TIL доступно меньше информации.

[001897] Интересно, что экспрессия PD-1 в подвергнутых экспансии PD-1+ TIL, как было показано, снижается с культивированием и экспансией, что интерпретируют как признак активизации TIL ex-vivo [10, 12].

[001898] Чтобы лучше понять статус истощения/ингибирования PD-1-отобранных

TIL, 13 пар аналогичных продуктов неотобранных и PD-1-отобранных TIL были проанализированы на предмет экспрессии четырех маркеров истощения/ингибирования LAG3, PD-1, TIM3 и CD101 с помощью проточной цитометрии. CD101 был связан с дисфункцией TIL на поздней стадии и был добавлен в наш стандартный список маркеров истощения [25]. Результаты показаны на фиг. 152.

[001899] PD-1-отобранные TIL экспрессировали все 4 проанализированных маркера истощения/ингибирования. LAG3 был обнаружен в от 1,75 до 37,8%, PD-1 - от 9,06 до 53,8%, TIM3 - от 8,65 до 54,9%, и CD101 - от 9,16 до 91,1%. Неотобранные TIL экспрессировали аналогичные уровни LAG3, TIM3 и CD101 по сравнению с отобранными продуктами, что снова указывает на то, что сортировка по PD-1+ TIL не вызывает значительного сдвига фенотипа готового продукта при экспансии in vitro. Только уровни PD-1 значительно различались между 2 продуктами, при этом PD-1-отобранный продукт экспрессировал более высокий процент PD-1+ клеток, чем неотобранные клетки. Однако количество PD-1+ клеток в PD-1-отобранных TIL существенно снизилось с 92,8% после сортировки до в среднем 27,1% после REP. Это согласуется с данными других авторов для TIL меланомы и НМРЛ и дает основания предполагать активизацию in vitro [10, 12].

[001900] Для сравнения степени понижающей регуляции PD-1, индуцированной in vitro экспансией, между PD-1-отобранными и неотобранными TIL, для обоих продуктов оценивали процентное содержание PD-1+ TIL до и после экспансии. Результаты показаны на фиг. 153.

[001901] Экспрессия PD-1 была значительно снижена в продуктах как PD-1-отобранных TIL (в среднем 27,1%, в диапазоне от 9,06 до 43,6), так и неотобранных TIL (в среднем 10,6%, в диапазоне от 4,93 до 29,3), по сравнению с исходными средними уровнями PD-1 92,8% и 37,3%, соответственно. Таким образом, процесс экспансии TIL одинаково влиял на оба препарата TIL с более чем 3-кратным снижением экспрессии PD-1.

Маркеры резидентных Т-клеток памяти в PD-1-отобранных TIL

[001902] Интегрины опосредуют удерживание лимфоцитов в периферической ткани. Некоторые из этих интегринов экспрессируются на субпопуляции Т-клеток, известных как резидентные Т-клетки памяти. Эти клетки, которые фенотипически сильно напоминают Т-клетки эффекторной памяти, не циркулируют и находятся в тканях.

[001903] Несколько интегринов, таких как αEβ7 (CD103), α1β1 (CD49a), экспрессируются на различных частях свежевыделенных TIL [7, 8]. Наряду с CD39, поверхностной молекулой Т-клеток, участвующей в аденозиновом пути и связанной с ингибирующим сигналом, CD49 и CD103 были идентифицированы на PD-1+ TIL, которые, как было показано, обладают противоопухолевой реактивностью [2, 8, 10]. Более того, коэкспрессия PD-1 и CD103 была связана с благоприятным клиническим исходом при раке яичника [9].

[001904] Чтобы определить, экспрессируют ли продукты PD1-отобранных TIL и неотобранных TIL маркеры, связанные с резидентными Т-клетками памяти, 13 опухолей были проанализированы на предмет экспрессии CD39, CD49a и CD103. См. фиг. 153.

[001905] Не наблюдали различий в процентном содержании CD49a+ и CD103+ клеток в PD-1-отобранных TIL относительно неотобранных TIL, тогда как экспрессия CD39 была значительно выше в PD-1-отобранных TIL, чем в неотобранных TIL. Различие может быть связано с более высокими уровнями CD39 в не подвергнутых экспансии PD-1+ TIL, о чем свидетельствует связь этого маркера со специфичностью к неоантигену [6]. В целом, указанный 3 маркера дифференциально экспрессировались в продуктах TIL.

ВЫВОДЫ

[001906] Наблюдаемые различия в фенотипической экспрессии проанализированных маркеров клеточной поверхности показаны в таблице 60 ниже. За исключением KLRG1, перечисленные фенотипические маркеры были существенно активированы в PD1-отобранных TIL по сравнению с неотобранными TIL.

Таблица 60: фенотипические маркеры, дифференциально экспрессируемые в $PD1^{+}$-отобранных TIL и неотобранных TIL

Дифференцировка	**Активация**	**Истощение**	**Резидентная память**
CD27	CD137	PD1	CD39
KLRG1			

[001907] PD-1-отобранные TIL представляются менее дифференцированными по сравнению с неотобранными TIL, о чем свидетельствует более высокая экспрессия CD27 и более низкие уровни KLRG1. Эффективность и лечебный потенциал TIL зависят от их способности к уничтожению и достаточно длительной персистенции, чтобы уничтожить все злокачественные клетки в опухоли [14, 24]. Следовательно, умеренно дифференцированный фенотип может быть положительным признаком PD-1-отобранных TIL.

[001908] PD-1-отобранные TIL экспрессировали более высокий процент CD137 и CD39 по сравнению с неотобранными TIL. Эти данные свидетельствуют о том, что PD-1-отобранные TTIL находятся в активированном состоянии, что может иметь потенциал для усиления их эффекторной функции после переноса in vivo.

[001909] В целом, полученные авторами результаты дают основания полагать, что подвергнутые экспансии PD-1-отобранные TIL состояли в основном из недифференцированных TEM с низкой экспрессией маркеров истощения, что позволяет предположить, что эти клетки снова активизировались при экспансии in vitro.

[001910] Фенотипические особенности PD-1-отобранных TIL сопоставимы с продуктами неотобранных TIL lifileucel и LN-145 от компании Iovance, которые показали клиническую эффективность при метастатической меланоме и раке шейки матки, соответственно.

ЦИТИРУЕМЫЕ ИСТОЧНИКИ ДЛЯ ПРИМЕРА 16

1. Jing, W., et al., *Adoptive cell therapy using PD-1(+) myeloma-reactive T cells eliminates established myeloma in mice.* J Immunother Cancer, 2017. **5**: p. 51.

2. Fernandez-Poma, S.M., et al., *Expansion of Tumor-Infiltrating CD8(+) T cells Expressing PD-1 Improves the Efficacy of Adoptive T-cell Therapy.* Cancer Res, 2017. **77**(13): p. 3672-3684.

3. Thommen, D.S., et al., *A transcriptionally and functionally distinct PD-1(+) CD8(+) T cell pool with predictive potential in non-small-cell lung cancer treated with PD-1 blockade.* Nat Med, 2018.

4. Ahmadzadeh, M., et al., *Tumor antigen-specific CD8 T cells infiltrating the tumor express high levels of PD-1 and are functionally impaired.* Blood, 2009. **114**(8): p. 1537-44.

5. Inozume, T., et al., *Selection of CD8+PD-1+ lymphocytes in fresh human melanomas enriches for tumor-reactive T cells.* J Immunother, 2010. **33**(9): p. 956-64.

6. Crompton, J.G., M. Sukumar, and N.P. Restifo, *Uncoupling T-cell expansion from effector differentiation in cell-based immunotherapy.* Immunol Rev, 2014. **257**(1): p. 264-276.

7. Westergaard, M.C.W., et al., *Tumour-reactive T cell subsets in the microenvironment of ovarian cancer.* Br J Cancer, 2019.

8. Bally, A.P., J.W. Austin, and J.M. Boss, *Genetic and Epigenetic Regulation of PD-1 Expression.* J Immunol, 2016. **196**(6): p. 2431-7.

9. Gros, A., et al., *PD-1 identifies the patient-specific CD8(+) tumor-reactive repertoire infiltrating human tumors.* J Clin Invest, 2014. **124**(5): p. 2246-59.

10. Golubovskaya, V. and L. Wu, *Different Subsets of T Cells, Memory, Effector Functions, and CAR-T Immunotherapy.* Cancers (Basel), 2016. **8**(3).

11. Kansy, B.A., et al., *PD-1 Status in CD8(+) T Cells Associates with Survival and Anti-PD-1 Therapeutic Outcomes in Head and Neck Cancer.* Cancer Res, 2017. **77**(22): p. 6353-6364.

12. Radvanyi, L.G., et al., *Specific lymphocyte subsets predict response to adoptive cell therapy using expanded autologous tumor-infiltrating lymphocytes in metastatic melanoma patients.* Clin Cancer Res, 2012. **18**(24): p. 6758-70.

13. Wolfl, M., et al., *Activation-induced expression of CD137 permits detection, isolation, and expansion of the full repertoire of CD8+ T cells responding to antigen without requiring knowledge of epitope specificities.* Blood, 2007. **110**(1): p. 201-10.

14. Duhen, T., et al., *Co-expression of CD39 and CD103 identifies tumor-reactive CD8 T cells in human solid tumors.* Nat Commun, 2018. **9**(1): p. 2724.

15. Rosenberg, S.A., et al., *Durable complete responses in heavily pretreated patients with metastatic melanoma using T-cell transfer immunotherapy.* Clin Cancer Res, 2011. **17**(13): p. 4550-7.

ПРИМЕР 17: ПОЛНОМАСШТАБНЫЙ ОТБОР PD1 TIL С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ НИВОЛУМАБА СОРТИРОВКОЙ ПОСРЕДСТВОМ ПРОТОЧНОЙ ЦИТОМЕТРИИ И ЭКСПАНСИЯ ДЛЯ КЛИНИЧЕСКОГО ПРОИЗВОДСТВА

ВВЕДЕНИЕ

[001911] Настоящий пример направлен на разработку протокола, предназначенного

для отбора PD1 TIL из гидролизатов опухолей для обогащения продукта TIL аутологичными опухолереактивными Т-клетками. В настоящем примере представлен протокол для получения PD1-отобранных TIL с использованием ниволумаба в качестве окрашивающего PD1 антитела вместо PE-конъюгированного клона № EH12.2H7.

ЦЕЛЬ

[001912] Целью этого протокола было разработать процесс сортировки PD1 TIL с использованием ниволумаба в качестве агента для отбора и экспансии для производства материала для клинических исследований.

ОБЛАСТЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

[001913] Область работы заключалась в экспансии отсортированных PD1 TIL из меланомы или опухолей легкого, головы и шеи или яичника с использованием протокола 2-REP, разработанного для полномасштабного клинического производства (фиг. 154).

[001914] Было проведено два мелкомасштабных и один полномасштабный эксперимент.

[001915] В день 0 гидролизат опухоли был равномерно распределен для очистки PD1 TIL с использованием нового метода окрашивания с использованием ниволумаба и метода окрашивания с использованием антитела к PD1 (EH12.2H7), и отсортирован на PD1 TIL методом проточной цитометрии.

[001916] Для мелкомасштабного процесса (масштаб 1/100) REP-1 инициировали в день 0 путем расчета 10% PD1 TIL с наименьшим результатом сортировки и переноса этого количества TIL из каждой сортировки в соответствующие колбы G-Rex-10M с фидерами и OKT-3 со средой, содержащей IL-2. REP-2 инициировали в соответствии с примером 9. Краткое объяснение соответствующих временных точек приведено ниже в разделе методов (фиг. 155).

[001917] Для полномасштабного процесса REP-1 инициировали в день 0 с использованием отсортированных по PD1 TIL с 100e6 аллогенных фидерных клеток и 30 нг/мл OKT3 в течение 11 дней. REP-2 будет инициирован на день 11 с использованием собранного продукта REP-1. REP-2 (день 11) и последующие процессы в день 16 и день 22 выполнялись в соответствии с протоколами производства партий IOVA. Краткое объяснение связанных временных точек приведено ниже в разделе методов (фиг. 154).

[001918] Для всех условий сбор на день 22 начинали с уменьшения объема с последующим подсчетом клеток на NC-200.

[001919] Подвергнутые экспансии TIL и готовый продукт оценивали на рост клеток, жизнеспособность, фенотип, длину теломер и функцию (секреция IFNγ и гранзима B, мобилизация CD107a).

4. МЕТОДЫ

[001920] Обзор мелкомасштабного и полномасштабного процессов PD1 Gen-2 после гидролиза

[001921] **Фиг. 155: обзор мелкомасштабного процесса:** PD1-A - это условие, при котором используется процедура окрашивания ниволумабом, описанная в этом протоколе.

PD1-B - это условие, при котором используется метод окрашивания анти-PD1-PE (клон № EH12.2H7). Условие общей популяции служит контролем.

Материал

Опухолевая ткань

[001922] Опухоли различной гистологии были получены от исследовательских альянсов и поставщиков тканей. Стандартные реагенты для выращивания TIL, которые включают: колбы G-Rex 100MCS и 500 MCS (Wilson Wolf, № по каталогу 81100-CS, 85500S-CS, соответственно); рекомбинантный IL-2 GMP (Cell-Genix, Германия, № по каталогу 1020-1000); GlutaMAX 100X (Thermofisher, № по каталогу 35050061); и гентамицин 50 мг/мл (Thermofisher, № по каталогу 15750060).

Реагенты для окрашивания в проточной цитометрии и анализа

Антитела для проточной цитометрии

[001923] Анти-PD1 PE, клон EH12.2H7, Biolegend, № по каталогу 329906

[001924] Анти-CD3 FITC, клон OKT3, Biolegend, № по каталогу 317306

[001925] Анти-IgG4 Fc-PE, клон HP6025, Southern Biotech, № по каталогу 9200-09

[001926] Ниволумаб [зарегистрированное патентованное название: опдиво] 10 мг/мл (Bristol-Myers Squibb, Нью-Йорк)

[001927] PE анти- IgG4 человека, клон HP6023, 0,5 мг/мл (BioLegend, Сан-Диего, № по каталогу 98155)

Сортировочный буфер

[001928] HBSS с 2% FBS.

Буфер для сбора

[001929] HBSS с 50% сыворотки hAB

ПРОЦЕДУРА

Подготовка опухолевой ткани

[001930] Свежерезецированные образцы опухоли были получены от исследовательских альянсов и поставщиков тканей. Опухоли отправляют срочной доставкой при 2-8°C в HypoThermosol (Biolife Solutions, Вашингтон, № по каталогу 101104) (с гентамицином (10 мг/мл) и амфотерицином B (250 мкг/мл)).

[001931] Делали фото опухоли во флаконе/пробирке. Вынимали опухоль из упаковки и промывали 3 раза в течение 2 минут для каждой промывки в буфере для промывки опухолей (отфильтрованный HBSS с 50 мкг/мл гентамицина).

[001932] Фрагментировали всю опухоль на фрагменты размером 4-6 мм^3 для подготовки для гидролиза опухоли. Хранили фрагменты размером 4-6 мм^3 в лунке 6-луночного планшета, содержащего 10 мл буфера для промывки опухолей/лунку.

Ферментный препарат для гидролиза опухолей

[001933] Опухоль подвергали гидролизу с использованием коллагеназы GMP, нейтральной протеазы и ДНКазы I, как описано в настоящем документе.

[001934] Лиофилизированные ферменты восстанавливали в количестве стерильного HBSS, указанном для каждого из ферментов для гидролиза, указанных ниже. Обязательно

собирают остатки порошка со стенок бутылок и с защитной пленки на горлышках бутылок. Несколько раз переливали пипеткой, а также вращали, чтобы обеспечить полное восстановление.

[001935] Восстанавливали коллагеназу AF-1 (Nordmark, Швеция, N0003554) в 10 мл стерильного HBSS. Лиофилизированный исходный препарат фермента имеет концентрацию 2892 PZ-Ед/флакон. Таким образом, после восстановления исходный препарат коллагеназы имел концентрацию 289,2 PZ-Ед/мл. **Следует обратить внимание, что исходный раствор ферментов может измениться, поэтому необходимо проверять концентрацию лиофилизированного исходного препарата и соответствующим образом изменять окончательное количество фермента, добавляемого в коктейль для гидролиза**. Отмеряли аликвоты по 100 мкл и хранили при -20 °C.

[001936] Восстанавливали нейтральную протеазу (Nordmark, Швеция, N0003553) в 1 мл стерильного HBSS. Лиофилизированный исходный препарат фермента имел концентрацию 175 DMC-Ед/флакон. Таким образом, после восстановления исходный препарат нейтральной протеазы имел концентрацию 175 DMC-Ед/мл. **Следует обратить внимание, что исходный раствор ферментов может измениться, поэтому необходимо проверять концентрацию лиофилизированного исходного препарата и соответствующим образом изменять окончательное количество фермента, добавляемого в коктейль для гидролиза**. Отмеряли аликвоты по 20 мкл и хранили при -20 °C.

[001937] Восстанавливали ДНКазу I (Roche, Швейцария, 03724751) в 1 мл стерильного HBSS. Лиофилизированный исходный препарат фермента имел концентрацию 4K-Ед/флакон. Таким образом, после восстановления исходный препарат ДНКазы имел концентрацию 4K-Ед/флакон. **Следует обратить внимание, что исходный раствор ферментов может измениться, поэтому необходимо проверять концентрацию лиофилизированного исходного препарата и соответствующим образом изменять окончательное количество фермента, добавляемого в коктейль для гидролиза**. Отмеряли аликвоты по 250 мкл и хранили при -20 °C.

[001938] Размораживали 3 компонента коктейля для гидролиза GMP и готовили рабочий коктейль для гидролиза GMP следующим образом: добавляли 10,2 мкл нейтральной протеазы (0,36 DMC-Ед/мл), 21,3 мкл коллагеназы AF-1 (1,2 PZ/мл) и 250 мкл ДНКазы I (200 Ед/мл) на 4,7 мл стерильного HBSS. Помещали коктейль для гидролиза непосредственно в C-tube.

Обработка опухолей и гидролиз

[001939] В GentleMACS OctoDissociator переносили фрагменты опухоли размером до 4-6 мм в каждую пробирку C-Tube от GentleMACS (C-tube) в 5 мл коктейля для гидролиза, указанного выше. Использовали дополнительную трубку GentleMACS C-Tube для дополнительных фрагментов опухоли.

[001940] Переносили каждую C-tube в GentleMACS OctoDissociator. Проводили гидролиз путем настройки гомогенизатора на соответствующую программу для соответствующей гистологии опухоли из перечисленных в таблице 61 ниже. Диссоциация

длилась примерно один час.

Таблица 61. Программы OctoDissociator от Miltenyi в зависимости от типа опухолевой ткани.

Тип опухолевой ткани	Обозначение	Программа
Меланома, рак яичника, ободочной кишки, гипофарингеальный рак и рак почки	Мягкий	37C_h_TDK_1
Рак легкого и предстательной железы	Средний	37C_h_TDK_2
Рак молочной железы, поджелудочной железы, гепатоклеточный рак, плоскоклеточная карцинома головы и шеи (ПКГШ)	Жесткий	37C_h_TDK_3

[001941] После гидролиза извлекали пробирку(и) C-tube из Octodissociator или встряхивателя и помещали ее в BSC. С помощью серологической пипетки на 25 мл удалили гидролизат из каждой C-tube и пропускали основной продукт гидролиза через клеточное сито на 70 мкм в коническую пробирку на 50 мл.

[001942] Примечание: не допускать разбрызгивания гидролизата из-за давления пипеточного дозатора. Аккуратно перелили раствор на клеточное сито на 70 мкм. Не касались фильтра кончиком пипетки.

[001943] Не претерпевшие гидролиз части опухоли могут не проходить через клеточное сито. Промойте пробирку(и) C-tube дополнительными 10 мл HBSS и пропустите смыв через клеточное сито. Наливали в коническую пробирку на 50 мл HBSS до достижения 50 мл.

[001944] Центрифугировали гидролизат при 400 x G в течение 5 минут при комнатной температуре (полное ускорение и полная остановка).

[001945] Переносили содержимое конической пробирки в BSC и аспирировали или сливали супернатант. Ресуспендировали осадок в 5 мл теплой CM1+6000 МЕ/мл IL-2 и перемешивали, переливая пипеткой 5-6 раз. Проводили 2 подсчета клеток на NC-200 без разведения.

[001946] Отложили 0,5-1 мл гидролизата в сторону для контроля общей массой и криоконсервировали 2 аликвоты по 500 мкл гидролизата для анализов противоопухолевой реактивности. Держали гидролизат на льду.

[001947] Примечание: обязательно заменять его колотым или гранулированным льдом, как только появится суспензия ледяной воды.

[001948] Равномерно распределяли оставшиеся клетки для процедуры окрашивания Anti-PD1 -PE (клон № EH12.2H7) и ниволумабом.

Окрашивание гидролизата опухоли в проточной цитометрии с использованием анти-PD1-PE (клон № EH12.2H7) и сортировка клеток

[001949] Первую половину гидролизата опухоли окрашивали анти-PD1-PE.

Окрашивание гидролизата опухоли в проточной цитометрии с использованием ниволумаба и сортировка клеток

[001950] Для второй части отберите примерно 1e5 клеток для неокрашенного отрицательного контроля и одноцветных компенсационных контролей PE и FITC в промаркированные конические пробирки на 15 мл. Оставшийся гидролизат опухоли будет окрашен ниволумабом и анти-IgG4-PE (вторичное антитело к ниволумабу).

[001951] Приготовление сортировочного буфера (2% FBS): аспирировали 2 мл HBSS из свежей бутылки HBSS на 500 мл и добавляли 10 мл FBS. Держали сортировочный буфер во льду до дальнейшего использования.

[001952] Приготовление рабочего раствора ниволумаба: для приготовления рабочего раствора выполняли разведение 1:100, добавляя 10 мкл ниволумаба [10 мг/мл] к 990 мкл сортировочного буфера.

Приготовление промежуточного разведения 1:50 IgG4:

[001953] Добавляли 10 мкл анти-IgG4-PE к 490 мкл сортировочного буфера в микроцентрифужной пробирке и осторожно вращали на вортексе в течение 5 секунд для тщательного перемешивания. Помещали промежуточное разведение на лед до дальнейшего использования.

Приготовление образца гидролизата опухоли для сортировки методом проточной цитометрии:

[001954] Используя приведенные выше данные о количестве клеток, рассчитывали количество клеток, оставшихся в пробирке с гидролизатом опухоли.

[001955] Добавляли 10 мл HBSS для гидролиза и центрифугировали при 400 x G в течение 5 минут при комнатной температуре (полное ускорение и полная остановка).

[001956] Переносили содержимое конической пробирки в BSC и сливали супернатант. Расчитывали объем (концентрацию TVC, объем сортировочного буфера для ресуспендирования, объем ниволумаба см. в таблице №) для ресуспендирования клеток при 10e6 клеток/мл с помощью сортировочного буфера.

[001957] Добавляли 10 мкл рабочего раствора ниволумаба на 1 мл клеток.

Таблица 62. Рекомендуемый для добавления объем сортировочного буфера для ресуспендирования и ниволумаба.

Вариант	**A**	**B**	**C**	**D**	**E**	**F**	**G**	**H**	**I**	**J**
TVC	< 20e6	>10e6 30e6	>20e6 40e6	>30e6 50e6	>40e6 60e6	>50e6 70e6	>60e6 80e6	>70e6 90e6	>80e6 100e6	>90e6-100e6
Объем для ресуспендирования	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Рабочий ниволумаб	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100

[001958] Осторожно перемешивали гидролизат с помощью микропипетки на 1 мл и инкубировали клетки на льду в течение 30 минут. Защищают от света во время инкубации. Во время инкубации осторожно встряхивали каждые 10 минут для обеспечения однородного окрашивания.

[001959] После инкубации добавляли 10 мл сортировочного буфера к образцу гидролизата, одноцветному компенсатору и неокрашенному отрицательному контролю.

[001960] Центрифугировали при 400 x G в течение 5 мин при комнатной температуре (полное ускорение и полная остановка).

[001961] Осторожно сливали образцы.

[001962] Осадок ресуспендировали в 400 мкл сортировочного буфера и с помощью серологической пипетки измеряли общий объем образца. Добавляли 3 мкл анти-CD3-FITC на 100 мкл и добавляли 50 мкл промежуточно разведенного анти-IgG4-PE (см. Раздел 9.5.3) на 500 мкл.

[001963] Осторожно перемешивали гидролизат с помощью микропипетки на 1 мл и инкубировали клетки на льду в течение 30 минут. Защищали от света во время инкубации. Во время инкубации осторожно встряхивали каждые 10 минут для обеспечения однородного окрашивания.

[001964] После инкубации добавляли к образцу гидролизата 10 мл сортировочного буфера.

[001965] Отфильтровывали гидролизат образца через клеточные сита на 70 мкм в промаркированные конические пробирки на 50 мл.

[001966] Центрифугировали при 400 x G в течение 5 мин при комнатной температуре (полное ускорение и полная остановка).

[001967] Ресуспендировали клетки в количестве до 10e6 клеток/мл в сортировочном буфере. Минимальный объем составляет 300 мкл и перенос в новую коническую пробирку на 15 мл.

[001968] Хранили пробирки на льду, накрытыми алюминиевой фольгой, до дальнейшего использования.

Приготовление одноцветной компенсации:

[001969] Компенсационный контроль PE окрашивали ниволумабом и вторичным анти-IgG4-PE, а компенсационный контроль FITC окрашивали анти-CD3-FITC.

[001970] Добавляли 10 мл HBSS в неокрашенные пробирки и пробирки с PE и FITC комп. и центрифугировали при 400 x G в течение 5 минут при комнатной температуре (полное ускорение и полная остановка).

Неокрашенная пробирка:

[001971] Ресуспендировали клетки в 500 мкл сортировочного буфера и хранили на льду до тех пор, пока другие образцы не были готовы для сортировки.

Пробирка FITC комп:

[001972] Ресуспендировали клетки в 100 мкл сортировочного буфера.

[001973] Добавляли 3 мкл анти-CD3-FITC на 100 мкл.

[001974] Осторожно перемешивали гидролизат с помощью микропипетки на 1 мл и инкубировали клетки на льду в течение 30 минут. Защищали от света во время инкубации, накрыв емкость со льдом алюминиевой фольгой.

[001975] Центрифугировали при 400 x G в течение 5 мин при комнатной температуре (полное ускорение и полная остановка).

[001976] Ресуспендировали клетки в 500 мкл сортировочного буфера и хранили во льду, пока другие образцы не были готовы для сортировки, накрытыми алюминиевой фольгой, до дальнейшего использования.

Пробирка PE комп:

[001977] Переносили содержимое конической пробирки в BSC и сливали супернатант. Ресуспендировали клетки в 1 мл сортировочного буфера.

[001978] Добавляли 10 мкл рабочего раствора ниволумаба на 1 мл клеток.

[001979] После инкубации добавляли 10 мл сортировочного буфера, центрифугировали при 400 x G в течение 5 минут при комнатной температуре (полное ускорение и полная остановка).

[001980] Осторожно сливали образцы, ресуспендировали осадок в 500 мкл сортировочного буфера и с помощью серологической пипетки измеряли общий объем образца. Добавляли 50 мкл промежуточно разведенного анти-IgG4-PE (см. Раздел 9.5.3) анти-IgG4-PE на 500 мкл клеток.

[001981] Осторожно перемешивали гидролизат с помощью микропипетки на 1 мл и инкубировали клетки на льду в течение 30 минут. Защищают от света во время инкубации.

[001982] Центрифугировали при 400 x G в течение 5 мин при комнатной температуре (полное ускорение и полная остановка).

[001983] Ресуспендировали клетки в 500 мкл сортировочного буфера и хранили во льду, пока другие образцы не были готовы для сортировки, накрытыми алюминиевой фольгой, до дальнейшего использования.

Подготовка пробирок для сбора:

[001984] Подготавливали пробирки на 15 мл для сбора отсортированных популяций. Помещали в пробирки 2 мл буфера для сбора (50% HBSS с 50% сыворотки hAB). Хранили пробирки для сбора на льду до дальнейшего использования.

Подсчет клеток и оценка жизнеспособности

[001985] Процедуры для подсчета клеток и определения жизнеспособности с использованием счетчика клеток Chemometec NC-200, как описано в настоящем документе.

Сортировка методом FACS с помощью Sony FX500

[001986] Сортировка методом проточной цитометрии PD1-отобранных TIL из гидролизата опухоли для процедуры сортировки и поддержания.

Протокол быстрой экспансии PD1 - полномасштабный REP, день 0 (REP-1)

Приготовление среды

[001987] Готовили 1 л CM1+6000 МЕ/мл IL-2 в инкубаторе при 37°C в течение по меньшей мере 24 часов.

[001988] **Подготовка фидерных клеток МНПК и высевание TIL для REP-1**

[001989] В примере 9 представлены инструкции по инициации полномасштабного процесса в день 0 (REP-1), за следующим исключением:

[001990] Наименьшее количество PD1-отобранных TIL, полученное в результате обеих сортировок, будет использовано в качестве количества PD1-отобранных TIL для добавления к условиям PD1-A и PD1-B. Рассчитывали объем соответствующих сортировок, чтобы получить это количество в условиях PD1-A и PD1-B. Переносили объемы TIL в соответствующие колбы G-Rex 100M.

Протокол быстрой экспансии PD1 - мелкомасштабный REP, день 0 (REP-1)

Приготовление среды

[001991] Готовили и предварительно нагревали 1 л CM1+6000 МЕ/мл IL-2 в инкубаторе при 37°C в течение по меньшей мере 24 часов.

Подготовка фидерных клеток МНПК

[001992] Размораживали подходящее количество флаконов для REP-1 (потребуется 10e6 на колбу; исходили из количества 60e6-80e6 МНПК на флакон на 1 мл)

[001993] Помещали 40 мл теплой CM1+6000 МЕ/мл IL-2 в коническую пробирку на 50 мл и пипеткой переносили фидеры МНПК из флаконов на 1 мл в коническую пробирку.

[001994] Переливали пипеткой размороженные фидеры МНПК, чтобы тщательно перемешать, и проводили 2 подсчета клеток на NC-200.

[001995] Рассчитывали и переносили объем, необходимый для переноса 10e6 МНПК в G-Rex 10M.

[001996] Добавляли в G-Rex 10M 3 мкл aCD3 (OKT-3). Помещали колбы в инкубатор.

Высевание TIL для REP-1

[001997] Рассчитывали 10% от самого низкого результата сортировки по PD1 и рассчитывали объем соответствующих сортировок для достижения этого количества как в условиях PD1-A, так и в условиях PD1- B. Переносили объемы TIL в соответствующие колбы G-Rex 10M.

[001998] Для контрольного условия общей массы TIL добавляли эквивалентное количество CD3+ клеток к клеткам PD1. Чтобы получить необходимый объем гидролизата, осуществляли следующие действия:

[001999] Рассчитывали CD3+ TVC/мл в гидролизате путем умножения полученных TVC гидролизата на % CD3+ живых клеток, полученный из самого низкого результата сортировки. (т. е. 10e6*10%=1e6).

[002000] После получения этого числа делили количество используемых клеток PD1 на это число. (т. е. 1e5/1e6=0,1 мл).

[002001] Добавляли этот объем (0,1 мл) гидролизата в колбу с основной массой TIL и заполняли до 100 мл с помощью CM1+6000 МЕ/мл IL-2.

[002002] Помещали все колбы в инкубатор при 37 ^{0}C, 5% CO2 9.10. Протокол быстрой экспансии PD1 - полномасштабный, день 11, 16 и 22

[002003] Полномасштабный процесс проводили в соответствии с протоколами производства партий. Условие общей массы TIL обрабатывали аналогично этапам, описанным в примере 9.

Критерии приемлемости

[002004] В таблице 63 ниже указаны критерии приемлемости, которые использовались для оценки показателей мелкомасштабного (экстраполированное TVC) и полномасштабного эксперимента.

Таблица 63. Тестирование и критерии приемлемости в ходе процесса и при выпуске собранного продукта

Тип теста	Метод	Критерий приемлемости
Тестирование в ходе процесса		
Чистота после сортировки (%PD1+)	Проточная цитометрия	> 80%
Тестирование при выпуске		
Внешний вид	Визуальный осмотр	Пакет не поврежден, комочков нет
Жизнеспособность клеток	Флуоресценция (LAB-056)	> 70%
Общее количество жизнеспособных клеток	Флуоресценция (LAB-056)	от 1×10^9 до 150×10^9
Чистота (%CD45+CD3+)	Проточная цитометрия (LAB-042)	> 90% CD45+CD3+ клеток
IFNg (стимулированные - нестимулированные)	Стимуляция гранулами и ELISA (LAB-016)	> 500 пг/мл

[002005] В таблице 64 ниже указаны дополнительные проведенные исследования характеристик готового продукта.

Таблица 64. Определение характеристик готового продукта (только в информационных целях)

Тип теста	Метод	Отчет о результатах
Чистота и фенотип субпопуляции Т-клеток памяти	Проточная цитометрия (LAB-055)	Отчет о результатах
Маркер фенотипа активации и истощения	Проточная цитометрия (LAB-061)	Отчет о результатах
Длина теломер	TAT (продолжительность жизни)	Отчет о результатах
Теломеразная активность	Q-TRAP (продолжительность жизни)	Отчет о результатах
Гранзим B	Стимуляция гранулами и ELISA (LAB-064)	Отчет о результатах
CD107A	Митогенная стимуляция и проточная цитометрия (LAB-061)	Отчет о результатах
Секвенирование TCR Vбета	Глубокое секвенирование (Irepertoire, Inc)	Отчет о результатах (если есть)
Анализ противоопухолевой реактивности/уничтожения опухолевых клеток	Совместное культивирование с гидролизатом опухоли/уничтожение опухоли	Отчет о результатах
Анализ метаболитов	Биохимический анализатор Cedex	Отчет о результатах

ПРИМЕР 17 ЦИТИРУЕМЫЕ ДОКУМЕНТЫ

[002006] **Примеры 6 и 7**, Отбор и экспансия PD1+ клеток непосредственно *ex vivo*: процесс для улучшения опухолереактивных TIL для ACT-терапии.

[002007] **Примеры 9**, Отбор и экспансия $PD1^+$ TIL для полномасштабного производства.

[002008] **Пример 10**, Отбор и экспансия $PD1^{hIgh}$ TIL для полномасштабного производства.

ПРИМЕР 18: ЭКСПРЕССИРУЮЩИЕ PD-1 КЛЕТКИ В ГИДРОЛИЗАТАХ ОПУХОЛЕЙ

ЦЕЛЬ

[002009] Оценить экспрессию белка программируемой клеточной смерти-1 (PD-1) в гидролизатах цельных опухолей.

ОБЛАСТЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

[002010] Гидролизаты цельных опухолей из следующих гистологий опухолей были оценены на экспрессию PD-1: меланома, немелкоклеточный рак легкого (НМРЛ), плоскоклеточная карцинома головы и шеи (ПКГШ), карцинома яичника (ОС), трижды негативная карцинома молочной железы (TNBC), рак предстательной железы (PC) и колоректальный рак (CRC).

ВВОДНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

[002011] PD-1 представляет собой многоаспектный фенотипический маркер, связанный с активацией, антигенной специфичностью и истощением. Он быстро индуцируется после активации и сохраняется на клетках, подвергшихся действию антигена, в условиях хронических заболеваний, включая рак [1, 2]. Молекулярно PD-1 является членом семейства CD28 регуляторных рецепторов клеточной поверхности и экспрессируется на хронически активированных Т-клетках, NKT-клетках, В-клетках и моноцитах [3-5]. Взаимодействие с его лигандами, PD-L1 и PD-L2, индуцирует сигнальные каскады, которые приводят к снижению активации, пролиферации, выживаемости Т-клеток и продукции ими цитокинов [6].

[002012] Несмотря на иммуноингибиторную роль PD-1, присутствие PD-1-экспрессирующих опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов (TIL) было связано с благоприятными клиническими исходами при ПКГШ и НМРЛ, что позволяет предположить, что эти TIL могут принимать участие в контроле прогрессирования опухоли [7-9].

[002013] Исследования на меланоме и НМРЛ показали, что большая часть опухолереактивных TIL содержалась в субпопуляции $PD\text{-}1^+$ Т-клеток [4, 8, 10].

[002014] Основываясь на представлении о том, что $PD\text{-}1^+$ TIL представляют собой неоантиген-/опухолеспецифические лимфоциты, Iovance разрабатывает новый продукт PD-1-отобранных TIL, LN-145-S1, обогащенный $PD\text{-}1^+$ TIL, отсортированными непосредственно из гидролизатов цельных опухолей.

[002015] Хотя экспрессия PD-1 необходима для ответа на терапию против PD-1, экспрессия PD-1 сама по себе не гарантирует ответ на терапию. Например, PD-1 присутствует на TIL при ОС, и его экспрессия коррелирует с выживаемостью [11]. Однако недавнее клиническое исследование ОС продемонстрировало, что препарат против PD-L1

авелумаб в сочетании с химиотерапией не увеличивал выживаемость без прогрессирования [12]. Это исследование, наряду с большим количеством пациентов, устойчивых к терапии против PD-1, которые экспрессируют PD-1$^+$ в микроокружении опухоли, демонстрирует, что блокады оси PD-1/PD-L1 in vivo недостаточно для контроля большинства видов рака.

[002016] Адоптивная Т-клеточная терапия с использованием TIL продемонстрировала замечательную эффективность у пациентов с меланомой, рефрактерных к препаратам против PD-1, указывая на то, что протоколы, используемые для экспансии TIL *ex vivo*, были способны активизировать TIL, в отличие от блокады PD-1 *in vivo* [13].

[002017] В этом примере исследована сортировка PD-1$^+$ TIL перед экспансией *ex vivo* в отношении дальнейшего улучшения степени ответа на терапию TIL во всех гистологиях PD-1$^+$ рака.

[002018] Целью настоящего исследования было исследовать гистологию нескольких опухолей на наличие PD-1$^+$ TIL, чтобы подтвердить возможность нацеливания на них с помощью продукта подвергнутых экспансии TIL в клинике.

ДИЗАЙН ЭКСПЕРИМЕНТА

[002019] Гидролизаты опухолей из нескольких гистологий опухолей оценивали на предмет экспрессии PD-1 с помощью проточной цитометрии.

МАТЕРИАЛЫ

[002020] Гидролизаты опухолей, использованные в этой работе, описаны в таблице 65. Сокращения: CRC (колоректальная карцинома), ПКГШ (плоскоклеточная карцинома головы и шеи), MSI (микросателлитная нестабильность), MSS (микросателлитная стабильность), ND-PBL (нормальные донорские лимфоциты периферической крови), НМРЛ (немелкоклеточный рак легкого), ОС (карцинома яичника), PD-1 (белок программируемой клеточной смерти-1), REP (протокол быстрой экспансии), TIL (опухоль-инфильтрирующие Т-клетки) и TNBC (трижды негативная карцинома молочной железы).

Таблица 65. Описание гидролизатов опухолей, использованных для этих исследований

Идентификационный № опухоли	**Гистология**	**Полученные PD1-отобранные TIL**
H3035	ПКГШ	Да
H3036	ПКГШ	Нет Загрязненная культура
H3037	ПКГШ	Нет Загрязненная культура
H3038	ПКГШ	Да
H3039	ПКГШ	Да
L4089	НМРЛ	Да

L4096	HMPJ	Да
L4097	HMPJ	Да
L4100	HMPJ	Да
L4101	HMPJ	Да
L4104	HMPJ	Да
L4106	HMPJ	Да
M1132	Меланома	Да
M1136	Меланома	Да
M1139	Меланома	Да
M1141	Меланома	Да
OV8030	Яичника	Да
OV8042	Яичника	Да
OV8042	Яичника	Да
T6049	TNBC	Да
T6056	TNBC	Да
T6058	TNBC	Да
T6060	TNBC	Да
OC20019	Предстательной железы	Да
OC20030	Предстательной железы	Да
CC10026	CRC	Нет Плохой выход клеток гидролизата
CC10027	CRC	Нет Плохой выход клеток гидролизата
CC10028	CRC	Да
CC10029	CRC	Да
CC10031	CRC	Нет Загрязненная культура
CC10034	CRC	Да
CC10037	CRC	Да
CC10039	CRC	Да

МЕТОДЫ

Обработка опухолей

[002021] Образцы тканей массой от 0,2 до 1,5 г были частично подвергнуты диссекции на фрагменты размером 4-6 мм и подвергнуты гидролизу с получением суспензии отдельных клеток, состоящей из опухолевых, стромальных и иммунных клеток. Тройной ферментный коктейль, включающий ДНКазу (500 МЕ/мл), гиалуронидазу (1 мг/мл) и коллагеназу IV (10 нг/мл), использовали для гидролиза ткани в течение 1 часа при 37°C и осторожном перемешивании.

Окрашивание на PD-1

[002022] Гидролизаты цельных опухолей окрашивали в соответствии с приведенной ниже таблицей. Клетки окрашивали в 100 мкл/1e6 клеток.

Таблица 66. Панель окрашивания на PD-1 проточной цитометрии

Антитело/Окрашивание	Клон	Флуорохром	Производитель	Количество (мкл/1e6 клеток)
7-AAD	N/A	N/A	BD Biosciences	20
CD3	UCHT1	FITC	BD Biosciences	3
CD4	OKT4	PE/Cy	BioLegend	1
PD-1	EH12.2H7	PE	BioLegend	2,5

Отбор по PD-1 и стратегия гейтирования

[002023] Окрашенные клетки помещали либо в сортировщик клеток FX500 (SONY, Нью-Йорк), либо в анализатор клеток ZE5 (BioRad, Калифорния) и анализировали на основе следующей стратегии гейтирования. Сначала отдельные клетки были идентифицированы на основе прямого и обратного или бокового светорассеяния. Затем живые клетки были гейтированы на основании отрицательной/низкой флуоресценции 7-AAD или голубой флуоресценции live-dead. TIL идентифицировали с помощью CD3. Клетки PD-1 идентифицировали с использованием нормальной донорской периферической крови (ND-PBL) в качестве контроля. Гейты для отбора по PD-1 помещали выше исходного уровня экспрессии PD-1 в ND-PBL. Анализ данных выполняли с использованием программного обеспечения FlowJo v8.1 Software (FlowJo LLC, Орегон). Результаты наносили на график с помощью GraphPad v8.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Экспрессия PD-1 в гидролизатах опухолей

[002024] Чтобы определить, какие гистологии были кандидатами на отбор по PD-1, экспрессию PD-1 оценивали в нескольких образцах опухолей из нескольких гистологий рака с использованием проточной цитометрии. В общей сложности 4 меланомы, 7 НМРЛ, 5 ПКГШ, 3 ОС, 5 TNBC, 2 РС и 8 CRC были протестированы в соответствии с процедурой TMP-18-015, сокращенно изложенной в разделе 5.2. CRC состояли как из микросателлитных стабильных (MSS) (n=6), так и из микросателлитных нестабильных (MSI) (n=2) опухолей. После гидролиза часть полученной суспензии отдельных клеток окрашивали на PD-1, анализировали методом проточной цитометрии и, если было доступно

>5e6 клеток, сортировали для получения PD-1$^+$ клеток. PD-1-отсортированные клетки подвергали двухэтапному процессу, который включает 11-дневный этап активации с последующим 11-дневным протоколом быстрой экспансии (REP) для получения PD-1-отобранных TIL. Идентификационный № опухоли, гистология и результат эксперимента представлены на фиг. 65. Результаты анализа методом проточной цитометрии представлены на фиг. 157.

[002025] Все проанализированные гидролизаты опухолей экспрессировали определенный процент PD-1$^+$ клеток в популяции CD3. % PD-1 варьировал от 11% до 78%, в среднем составляя 35% для исследованных гистологий. Меланома (n=4) и РС (n=2) дали самые низкие средние значения экспрессии PD-1: 30,1% и 25,8%, соответственно. Средний процент экспрессии PD-1 не коррелировал с наблюдаемыми показателями клинического ответа для этих гистологий. Гистологии, которые отвечают на блокаду анти-PD-1, такие как меланома и НМРЛ, не имели более высокого уровня/экспрессии PD-1, чем гистологии, которые не отвечают на блокаду анти-PD-1 (т. е. ОС и РС).

[002026] PD-1-отобранный продукт может быть получен после экспансии PD-1$^+$ клеток *in vitro* во всех случаях, когда может быть инициировано культивирование (таблица 1). Результаты этого исследования представлены в документе Пример 13. Следовательно, на основе экспрессии PD-1 все проанализированные гистологии являются потенциальными кандидатами для отбора по PD-1.

ВЫВОДЫ

[002027] PD-1 экспрессировался на клетках CD3 во всех проанализированных гидролизатах опухолей.

[002028] Наблюдалась значительная внутри- и межопухолевая вариабельность экспрессии PD-1.

[002029] Экспрессия PD-1 не коррелирует с гистологиями, которые продемонстрировали восприимчивость к терапии анти-PD-1.

ПРИМЕР 18 ЦИТИРУЕМЫЕ ДОКУМЕНТЫ

1. Simon, S. and N. Labarriere, *PD-1 expression on tumor-specific T cells: Friend or foe for immunotherapy?* Oncoimmunology, 2017. **7**(1): p. e1364828.

2. Simon, S., et al., *PD-1 expression conditions T cell avidity within an antigen-specific repertoire.* Oncoimmunology, 2016. **5**(1): p. e1104448.

3. Ahmadzadeh, M., et al., *Tumor antigen-specific CD8 T cells infiltrating the tumor express high levels of PD-1 and are functionally impaired.* Blood, 2009. **114**(8): p. 1537-44.

4. Inozume, T., et al., *Selection of CD8+PD-1+ lymphocytes in fresh human melanomas enriches for tumor-reactive T cells.* J Immunother, 2010. **33**(9): p. 956-64.

5. Melssen, M.M., et al., *Formation and phenotypic characterization of CD49a, CD49b and CD103 expressing CD8 T cell populations in human metastatic melanoma.* Oncoimmunology, 2018. **7**(10): p. e1490855.

6. Lee, J., et al., *Reinvigorating Exhausted T Cells by Blockade of the PD-1 Pathway.* For Immunopathol Dis Therap, 2015. **6**(1-2): p. 7-17.

7. Badoual, C., et al., *PD-1-expressing tumor-infiltrating T cells are a favorable prognostic biomarker in HPV-associated head and neck cancer.* Cancer Res, 2013. **73**(1): p. 128-38.

8. Thommen, D.S., et al., *A transcriptionally and functionally distinct PD-1(+) CD8(+) T cell pool with predictive potential in non-small-cell lung cancer treated with PD-1 blockade.* Nat Med, 2018.

9. Kansy, B.A., et al., *PD-1 Status in CD8(+) T Cells Associates with Survival and Anti-PD-1 Therapeutic Outcomes in Head and Neck Cancer.* Cancer Res, 2017. **77**(22): p. 6353-6364.

10. Gros, A., et al., *PD-1 identifies the patient-specific CD8(+) tumor-reactive repertoire infiltrating human tumors.* J Clin Invest, 2014. **124**(5): p. 2246-59.

11. Webb, J.R., K. Milne, and B.H. Nelson, *PD-1 and CD103 Are Widely Coexpressed on Prognostically Favorable Intraepithelial CD8 T Cells in Human Ovarian Cancer.* Cancer Immunol Res, 2015. **3**(8): p. 926-35.

12. Columbus, G. *Avelumab Misses Primary Endpoints in Phase III Ovarian Cancer Trial.* 2018; доступно по ссылке: https://www.onclive.com/web-exclusives/avelumab-misses-primary-endpoints-in-phase-iii-ovarian-cancer-trial.

13. Sarniak, A. *A phase 2, multicenter study to assess the efficacy and safety of autologous tumor-infiltrating lymphocytes (LN-144) for the treatment of patients with metastatic melanoma.* 2018; доступно по ссылке: https://ascopubs.org/doi/abs/10.1200/JCO.2018.36.15_suppl.TPS9595.

ПРИМЕР 19: ПОЛНОМАСШТАБНЫЙ ОТБОР PD-1$^+$ TIL С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ НИВОЛУМАБА СОРТИРОВКОЙ ПОСРЕДСТВОМ ПРОТОЧНОЙ ЦИТОМЕТРИИ И ЭКСПАНСИЯ ДЛЯ КЛИНИЧЕСКОГО ПРОИЗВОДСТВА

ЦЕЛЬ

[002030] В этом отчете описаны результаты экспансии PD-1-отобранных TIL с использованием ниволумаба для отбора в экспериментах по полномасштабному производству, описанных в настоящих примерах.

ОБЛАСТЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

[002031] Область работы заключалась в экспансии PD-1-отобранных TIL из меланомы или опухолей легкого, головы и шеи или яичника.

[002032] В день 0 гидролизат опухоли был равномерно распределен между двумя группами, и гидролизат опухоли в каждой группе эксперимента окрашивали с использованием либо ниволумаба, либо анти-PD1 клона № EH12.2H7 (высокой чистоты) в качестве первичного антитела, и конъюгированного с FITC вторичного антитела против IgG4. Затем отбирали экспрессирующие PD-1 TIL из окрашенных популяций путем проточной сортировки. Для экспансии PD-1-отобранных TIL использовали двухэтапный процесс экспансии для полномасштабного клинического производства. Первый этап экспансии («Активация») проводили с дня 0 по день 11. Второй этап процесса экспансии («Фаза быстрой экспансии» или «REP», включая разделение на день16) проводили с дня 11 по день 22. Готовый продукт собирали на день 22.

[002033] Для мелкомасштабного процесса (масштаб 1/100) Активацию

инициировали в день 0, используя 10% PD-1-отобранных TIL с наименьшим результатом сортировки и перенося это количество TIL из каждой сортировки в соответствующие колбы G-Rex-10M с фидерами и OKT-3 со средой, содержащей IL-2. REP, Разделение и Сбор инициировали согласно TP-19-004. Краткое объяснение связанных временных точек приведено ниже в разделе методов (таблица 67).

[002034] Для полномасштабного процесса Активацию инициировали в день 0 с использованием PD-1-отобранных TIL с аналогичным количеством клеток, 100e6 аллогенных фидерных клеток и 30 нг/мл OKT3 в течение 11 дней. REP инициировали на день 11 на собранном продукте. REP (день 11) и последующие процессы в день 16 (Разделение) и день 22 (Сбор) выполняли в соответствии с протоколами производства партий IOVA. Краткое объяснение связанных временных точек приведено ниже в разделе Дизайн эксперимента (таблица 2).

[002035] Подвергнутый экспансии готовый продукт TIL оценивали на рост клеток, жизнеспособность, фенотип и функцию (секреция IFN-γ и гранзима B, мобилизация CD107a при стимуляции).

[002036] Чтобы установить эквивалентность EH12.2H7 и ниволумаба, был проведен дополнительный анализ данных расширенной характеристики.

ВВОДНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

[002037] Ранее созданный протокол, разработанный для отбора TIL, экспрессирующих PD-1, из гидролизатов опухолей с использованием PE-конъюгированного антитела к PD-1 (клон № EH12.2H7) для обогащения продукта TIL аутологичными опухолереактивными Т-клетками, представлен в примере 9 и примере 21.

[002038] В текущем исследовании пример 9 и пример 21 были адаптированы для получения PD1-отобранных TIL с использованием ниволумаба в качестве антитела к PD1 вместо PE-конъюгированного клона № EH12.2H7 и с использованием FITC-конъюгированного антитела к IgG4 в качестве вторичного окрашивающего антитела.

ДИЗАЙН ЭКСПЕРИМЕНТА

[002039] В соответствии с TP-19-004 были проведены два мелкомасштабных эксперимента и условия контроля общей массой.

[002040] Один полномасштабный эксперимент был проведен согласно примеру 19.

[002041] Обзор мелкомасштабных и полномасштабных экспериментов представлен в таблицах 67 и 68.

Таблица 67. Обзор мелкомасштабного процесса PD-1-отобранных TIL в масштабе 1/100

Условие	**Масштаб 1/100**
Активация (масштаб 1/10) TIL Фидеры	**День 0:** Активация 10% PD-1-отобранных TIL 10e6

CM1 IL-2 OKT3 (30 нг/мл) G-Rex	100 мл 6000 МЕ/мл 30 нг/мл 10M
REP (масштаб 1/100) TIL Фидеры CM2 IL-2 OKT3 (30 нг/мл) G-Rex	**День 11:** REP 10% TVC 50e6 50 мл 3000 МЕ/мл 30 нг/мл 5M
Разделение (масштаб 1/100)	**День 16:** Уменьшение объема и разделение (TVC/10e6, округление) на вплоть до 5 колб 5M
Сбор REP (масштаб 1/100)	**День 22:** Сбор REP
Расчет экстраполяции: Активация REP, Разделение, Сбор	Умножить TVC Сбора в Активации на 10 Умножить сбор в REP на 100 x количество колб при разделении

Таблица 68. Обзор полномасштабного процесса PD-1-отобранных TIL

Условия	**Полномасштабный**
Активация TIL Фидеры CM1 IL-2 OKT3 (30 нг/мл) G-Rex	**День 0:** Активация PD-1-отобранные TIL 100e6 1000 мл 6000 МЕ/мл 30 нг/мл 100MCS
REP TIL Фидеры CM2 IL-2	**День 11:** REP 5e6-200e6 TVC 5e9 5 л 3000 МЕ/мл

OKT3 (30 нг/мл) G-Rex	30 нг/мл 500MCS
Разделение	**День 16:** Разделение Уменьшение объема и разделение на вплоть до 5 G-Rex500 MCS в CM4+3000 МЕ/мл IL-2
Сбор REP	**День 22:** Сбор Сбор в REP

Результаты

[002042] В таблице 69 ниже указаны критерии приемлемости, которые использовались для оценки показателей мелкомасштабного (экстраполированное TVC) и полномасштабного эксперимента согласно примеру 19.

Таблица 69. Тестирование и критерии приемлемости в ходе процесса и при выпуске собранного продукта

Тип теста	Метод	Критерий приемлемости
Тестирование в ходе процесса		
Чистота после сортировки (%PD1+)	Проточная цитометрия	≥ 80%
Тестирование при выпуске		
Внешний вид	Визуальный осмотр*	Пакет не поврежден, комочков нет
Жизнеспособность клеток	Флуоресценция	≥ 70%
Общее количество жизнеспособных клеток	Флуоресценция	от 1×10^9 до 150×10^9
Чистота (%CD45+CD3+)	Проточная цитометрия	≥ 90% CD45+CD3+ клеток
IFNg (стимулированные - нестимулированные)	Стимуляция гранулами и ELISA	≥ 500 пг/мл

*Применимо только к полномасштабному эксперименту.

ПОЛУЧЕННЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ

[002043] В таблице 70 ниже приведены списки опухолей, использованных в этом исследовании, и связанных с ними гистологий.

Таблица 70: Опухоли, использованные в этом исследовании

Эксперименты	Гистология	Идентификационный №

Процесс PD-1-отобранных TIL (предполагаемый клинический процесс производства)		
Мелкомасштабный 1	Яичника	OV8074
Мелкомасштабный 2	Меланома	M1156
Полномасштабный 1	Головы и шеи	H3046

[002044] Результаты проточной сортировки

Таблица 71: чистота PD-1-отобранных TIL до и после сортировки методом проточной цитометрии.

Параметр	**Критерий приемлемости**	OV8074 (Ниволумаб)	OV8074 (EH12.2.H7)	M1156 (Ниволумаб)	M1156 (EH12.2.H7)	H3046 (Ниволумаб)	H3046 (EH12.2.H7)
% CD3+ до сортировки (из FSC/BSC, синглетов)	N/A	66	62	5	5	49	44
% PD-1+ до сортировки (из CD3+)	N/A	80	70	90	93	14	13
TVC до сортировки	N/A	6,3e6	2,6e6	1,3e7	1,3e7	1,6e7	1,6e7
TVC после сортировки (% выход)	N/A	3,5e5 (6%)	4,1e5 (16%)	1,1e5 (13%)	1,1e5 (13%)	1e5 (9%)	2,4e5 (23%)
Обогащение PD-1^{+} после сортировки (кратность)	N/A	1,24	1,4	1,07	1,08	6,8	7,4
*% чистота PD-1^{+} после сортировки (из % CD3+)	$\geq$ 80%	99%	98%	96%	100%	95%	96%

* *Чистота была основана на % PD-1+ (гейтированных по FSC/BSC/CD3)*

[002045] Чистота после сортировки (%PD-1+) для всех трех опухолей удовлетворяла критерию > 80%.

Результаты активации и сбора в REP

[002046] В таблице 72 ниже приведены сводные данные по общему количеству жизнеспособных клеток и свойствам продукта из двух мелкомасштабных и одного полномасштабного эксперимента, а также их аналогов в виде общей массы (отмечены в скобках).

Таблица 72: сводные данные по свойствам продукта после Активации и REP

Этапы	**Идентификационный № опухоли/условие**	**Критерий приемлемости**	**OV8074**		**M1156**		**H3046**	
			Окрашивание ниволумабом	**Окрашивание EH12.2H7**	**Окрашивание ниволумабом**	**Окрашивание EH12.2H7**	**Окрашивание ниволумабом**	**Окрашивание EH12.2H7**
Активация	TVC высеяно (Общая масса[1])	N/A	3,48e5 (3,48e5)	3,48e5	1,05e5 (1,05e5)	1,05e5	1,02e5 (1,02e5)	1,02e5
	TVC собрано (общая масса[1])	N/A	1,03e9 (1,14e9)	1,71e9	2,08e8 (2,19e8)	1,50e8	1,3e8 (1,37e9)	1,52e8
	Кратность экспансии[3] (общая масса)	N/A	2960 (3262)	4905	1975 (2079)	1427	1291 (1334)	1486
	Кол-во удвоений С Д0 по Д11[4]	N/A	12	12	11	10	10	11
REP	TVC высеяно (Общая масса[1])	5-200e6[2]	2,00e8 (2,00e8)	2,00e8	2,00e8 (2,00e8)	1,50e8	1,32e8 (2.00e8)	1,52e8
	TVC собрано (общая	N/A	114,08e9 (99e9)	95,94e9	86,82e9 (105,00e9)	84,14e9	95,2e9 (80,81e9)	80,98e9

	масса[1])							
	% Жизнеспособности	N/A	89	84	97	93	97	97
	Кратность экспансии[3] (общая масса)	N/A	570 (495)	480	434 (525)	559	720	612
	Кол-во удвоений С Д11 по Д22[4]	N/A	9,2	8,9	8,8	9,1	9,5	9,1
	TVC после LOVO (% выход)	1-150e9	N/A[5]				88,5e9 (93%)[7]	N/A[6]
	% Жизнеспособности после LOVO	> 70%	N/A[5]				85	N/A[6]
	%CD45+/CD3+	> 90%	99,7	99,8	99,8	99,9	99,7	99,9
	IFNγ (пг/мл)	≥ 500	948	1547	4555	4371	2795	3130
	Гранзим В (пг/мл)	N/A	9524	9777	41603	68354	33147	47603
	% CD4+CD107A (стимулированные)	N/A	49	58	34	41	37	38
	% CD8+CD107A	N/A	82	84	85	85	66	67

	(стимулир ованные)							

[1] Показанные выше TVC для условия общей массы экстраполированы на весь масштаб и являются контролем для ниволумаба и EH12.2H7

[2] Диапазон для 5-200e6 TVC, высеянных в REP, основан на текущем установленном диапазоне для процесса REP Gen 2 и не является формальным критерием приемлемости в протоколе

[3] Кратность экспансии=TVC собрано/TVC высеяно

[4] Удвоения клеток рассчитывали по формуле «=LOG(TVC в День 22/TVC в День 11)/LOG(2)»

[5] Партии были мелкомасштабными, LOVO не проводили

[6] Была доступна одна операция LOVO. Условие ниволумаба было выбрано для обработки LOVO, это представляет собой клиническое производство для процесса PD-1-отобранных TIL.

[7] Проблема счетчика клеток NC-200 была обнаружена в процессе подсчета после LOVO. Подсчет выхода после размораживания из исследования стабильности (SP-19-003) использовали для расчета % восстановления.

[002047] Выход процесса: по окончании Активации TIL, отобранные с использованием окрашивания либо ниволумабом, либо EH12, давали количество клеток более 100e6 (>1200-кратное увеличение, в среднем 9,1 удвоений клеток) с достаточным выходом для инициации культивирования REP.

[002048] При сборе в REP все культуры давали TVC > 80e9. В среднем со дня 11 по день 22 наблюдалось 9 удвоений клеток. Количество удвоений клеток было очень похоже на результаты, полученные в предыдущих доклинических экспериментах (TP-19-004R и ПРИМЕР 21R).

[002049] Доза: из полномасштабного анализа (H3046) доза готового продукта с использованием окрашивания ниволумабом составила 88,5e9 TVC с 85% жизнеспособностью и 99,7% CD45+CD3+ клеток. Готовый продукт представлял собой высокообогащенный продукт TIL.

[002050] Функция: функциональность TIL была охарактеризована на основе стимуляции готового продукта в течение ночи с помощью aCD3/aCD28/aCD137 Dynabeads (LAB-016). Супернатанты собирали через 24 часа после стимуляции и замораживали. Проводили ELISA для анализа концентраций IFNγ и гранзима B, высвобожденных в супернатанты. Высвобождение IFNγ удовлетворяло критерию приемлемости, и все культуры TIL секретировали высокие уровни гранзима B при стимуляции. Аналогично продуктам TIL, полученным в предыдущем исследовании (TP-19-004R, ПРИМЕР 21), высокая часть TIL из готового продукта экспрессировала CD107A при стимуляции PMA/IO (как CD4+, так и CD8+ TIL).

[002051] **Длина теломер TIL и теломеразная активность:** Данные еще не получены. В отчет будут внесены поправки для включения этих данных, когда они будут

доступны.

[002052] **Клональность TIL:** данные еще не получены. В отчет будут внесены поправки для включения этих данных, когда они будут доступны.

[002053] **Расширенное фенотипирование:** в таблицах 73, 74, 75 описан расширенный анализ фенотипа TIL. Многоцветная проточная цитометрия использовалась для определения чистоты TIL, принадлежности, субпопуляции памяти, активации и статуса истощения REP TIL. В готовых собранных TIL присутствовало < 1% детектируемых B-клеток, моноцитов или NK-клеток (таблица 7). REP TIL в основном состоит из TCRαβ с дифференцировкой главным образом эффекторной памяти. Соотношение CD8/CD4 для ниволумаба и EH12.2H7 сопоставимо, за исключением опухоли яичника. Сдвиг соотношения CD8/CD4 может быть связана с гетерогенностью типа опухоли яичника и отсутствием маркера отбора для CD4 и CD8 в процедуре отбора.

Таблица 73: Чистота, принадлежность и фенотипическая характеристика памяти TIL

Характеристика		**OV8074 (Ниволумаб)**	**OV8074 (EH12)**	**M1156 (Ниволумаб)**	**M1156 (EH12)**	**H3046 (Ниволумаб)**	**H3046 (EH12)**
Чистота	NK-клетки (CD3-CD56+) (%)	0,5	0,4	0,2	0,6	0,0	0,0
	B-клетки (CD3-CD19+) (%)	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	Моноциты (CD14+) (%)	0,5	0,5	0,9	0,8	0,8	0,9
Принадлежность Т-клеток	TCRα/β (%)	97,1	95,8	98,4	97,9	98,4	98,6
	TCRγ/δ (%)	0,1	0,3	0,0	0,0	0,0	0,1
	TCRα/β+ CD4+ (%)	19,0	40,7	19,7	10,0	64,7	62,0
	TCRα/β+ CD8+ (%)	80,5	57,2	79,9	89,5	34,6	37,6
	Соотношение TCRα/β+ CD8/CD4	4,2	1,4	4,1	9,0	0,5	0,6
Фенотип	Наивные:	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

памяти-TCRα/β+	CCR7+CD45RA+ (%)						
	T-EM: CCR7-CD45RA-(%)	98,4	98,2	98,6	98,2	98,4	97,1
	T-CM: CCR7+CD45RA-(%)	1,4	1,8	1,4	1,7	1,6	2,8
	T-EFF/TEMRA: CCR7-CD45RA+(%)	0,2	0,0	0,0	0,1	0,0	0,0

Примечание: алгоритм гейтирования для чистоты TIL показан ниже:

Моноциты: %живых, CD14+

NK-клетки (естественные киллеры): %живых, CD14-, CD3-, CD56+CD16+

B-клетки: %живых, CD14-, CD3-, CD19+

[002054] Из-за TCR-стимулированной пролиферации TIL все условия PD-1-отобранных TIL, продемонстрировали повышающую регуляцию экспрессии CD28 и понижающую регуляцию экспрессии CD27. Кроме того, все PD-1-отобранные TIL продемонстрировали менее дифференцированный фенотип с более низкой экспрессией KLRG1.

[002055] Уровни CD27, CD28, CD56, CD57, BTLA, CD25 и CD69 были аналогичны результатам для TIL меланомы, полученным с использованием процесса производства Gen 2 (таблица 74).

[002056] Между процедурами отбора с помощью ниволумаба и EH12.2H7 нет заметных различий в плане дифференцировки, активации и статуса истощения.

Таблица 74: статус активации и истощения CD4+ TIL

Характеристика (Гейтированы как Живые, CD3+, CD4+)		**OV8074 (Ниволумаб)**	**OV8074 (EH12)**	**M1156 (Ниволумаб)**	**M1156 (EH12)**	**H3046 (Ниволумаб)**	**H3046 (EH12)**
Дифференцировка	**CD27+ (%)**	5,1	6,1	5,5	12,7	34,6	39,3
	CD28+ (%)	99,9	99,9	99,9	99,9	100,0	100,0
	CD57+ (%)	27,1	16,2	65,1	37,6	13,2	14,5

	KLRG1+ (%)	12,0	19,9	41,9	31,5	3,4	6,6
Активация	**2B4+ (%)**	4,1	8,7	4,8	4,8	4,0	6,1
	BTLA4+ (%)	99,4	99,7	99,8	99,7	99,9	100
	CD25+ (%)	4,8	3,4	2,6	4,1	2,4	2,9
	CD69+ (%)	79,4	77,0	84,6	77,3	75,9	86,9
	CD95+ (%)	96,7	97,5	98,9	99,6	99,5	99,7
	CD103+ (%)	0,6	0,4	1,0	0,5	1,0	1,0
Истощение	**LAG3+ (%)**	1,9	3,0	2,7	1,4	1,6	0,9
	PD1+ (%)	11,8	12,0	16,5	24,1	16,2	13,9
	TIGIT+ (%)	15,0	24,0	33,3	51,7	31,4	37,6
	TIM3+ (%)	11,1	20,7	36,4	26,3	18,4	19,8

Таблица 75: статус активации и истощения CD8+ TIL

Характеристика (Гейтированы как Живые, CD3+, CD8+)		**OV8074 (Ниволумаб)**	**OV8074 (EH12)**	**M1156 (Ниволумаб)**	**M1156 (EH12)**	**H3046 (Ниволумаб)**	**H3046 (EH12)**
Дифференцировка	**CD27+ (%)**	10,3	8,7	27,2	24,5	23,1	28,1

	CD28 + (%)	99,9	99,8	99,9	99,9	99,8	99,9
	CD57 + (%)	39	17,7	52,8	38,7	15,5	11,8
	KLR G1+ (%)	36,9	23,7	15,5	9,9	4,1	6,1
Активация	**2B4+ (%)**	3,2	3,5	2,3	2,1	4,0	4,0
	BTL A4+ (%)	99,7	99,8	99,8	99,8	99,9	99,9
	CD25 + (%)	0,5	0,9	0,2	0,4	0,6	0,5
	CD69 + (%)	76,1	74,4	81,6	84,4	86,2	87,2
	CD95 + (%)	95,3	88,7	98,9	98,5	96,5	96,6
	CD103+ (%)	0,5	0,5	0,8	0,3	0,9	0,6
Истощение	**LAG 3+ (%)**	0,6	1,8	1,9	0,9	1,5	0,9
	PD1+ (%)	12,1	4,7	11,7	14,6	7,6	10
	TIGIT+ (%)	51,6	42,7	78,7	85,5	17	19,8
	TIM3 + (%)	15,3	22,1	27,3	49,1	21	16,2

Таблица 76: экспрессия CD27, CD28, CD56, CD57, BTLA, CD25 и CD69 на CD3+

Характеристика	**Ранее получен**	**OV8074 (Ниволум**	**OV8074**	**M1156 (Ниволум**	**M1156**	**H3046 (Ниволум**	**H3046**

(Гейтированы как Живые, CD3+)	ные значения для меланомы (Диапазон)	аб)	(EH12)	аб)	(EH12)	аб)	(EH12)
CD27+ (%)							
CD28+ (%)							
CD56+ (%)							
CD57+ (%)							
BTLA+ (%)							
CD25+ (%)							
CD69+ (%)							

Дополнительный анализ данных расширенной характеристики, чтобы установить эквивалентность EH12.2H7 и ниволумаба.

[002057] PD-1-отобранные TIL, полученные с использованием EH12.2H7 и ниволумаба для получения PD-1$^+$ TIL, оценивали на предмет экспрессии CD4, CD8, CCR7, CD45RA и PD-1 с помощью проточной цитометрии. Никаких значимых различий в экспрессии CD4 и CD8 в PD-1-отобранных клетках, полученных с использованием ниволумаба и EH12.2H7, не наблюдалось. Для трех исследованных опухолей оба продукта TIL давали более высокую долю CD8$^+$ Т-клеток по сравнению с CD4$^+$ Т-клетками (фиг. 1). Сходство экспрессии CD4 и CD8 в трех продуктах PD-1-отобранных TIL указывает на то, что отбор по PD-1+ с использованием ниволумаба не изменил соотношение CD4/CD8 по сравнению с EH12.2H7. См. фиг. 159.

[002058] Как и линия Т-клеток, статус памяти TIL был схожим в PD-1-отобранных TIL, полученных с использованием EH12.2H7 и ниволумаба. Популяции TIL состояли преимущественно из Т-клеток эффекторной памяти. PD-1-отобранные TIL, полученные с использованием ниволумаба и EH12.2H7, похожи на экспериментальный препарат LN-145 компании Iovance, что дает основания полагать, что отбор по PD-1 с использованием любого клона к PD-1 не искажает фенотип памяти TIL (фиг. 160).

[002059] Чтобы оценить, снижалась ли экспрессия PD-1 аналогичным образом при культивировании, PD-1-отобранные TIL, полученные с использованием ниволумаба и EH12.2H7, оценивали до и после экспансии. После сортировки процентное содержание PD-1+ TIL было близко к 100% в обоих свежеотсортированных препаратах TIL (таблица 71). Экспрессия PD-1 была значительно и сравнительно снижена после экспансии в PD-1-отобранных клетках, полученных с использованием EH12.2H7 и ниволумаба (фиг. 161). Как и предполагалось, снижение экспрессии PD-1 при экспансии указывает на то, что ранее

высокие экспрессоры PD-1 в PD-1+ отсортированных TIL с использованием EH12.2H7 и ниволумаба с экспансией в основном вернулись в PD-1-.

[002060] Функциональная характеристика PD-1-отобранных TIL, полученных из PD-1+ TIL, отсортированных с помощью EH12.2H7 и ниволумаба

[002061] Чтобы оценить, были ли подвергнутые экспансии PD-1+ TIL, полученные с использованием ниволумаба, аналогичны функциональным TIL, полученным с использованием клона EH12.2H7, PD-1-отобранные TIL из 3 опухолей неспецифически стимулировали с помощью активирующих гранул αCD3/αCD28/α41BB и оценивали на предмет секреции IFNγ и гранзима B. PD-1-отобранные TIL, полученные с использованием ниволумаба и EH12.2H7, продуцировали аналогичные уровни IFNγ и гранзима B в ответ на стимуляцию (фиг. 161). PD-1-отобранные TIL, полученные с использованием ниволумаба и EH12.2H7, секретировали заметные уровни IFNγ и гранзима B в ответ на неспецифическую стимуляцию (гранулы αCD3/αCD28/αCD137), что дает основания полагать, что отобранные TIL были в высокой степени функциональными после экспансии.

ИНФОРМАЦИЯ

[002062] В день 0 из-за логистических проблем не удалось получить свежую опухоль для этого примера. Все эксперименты проводили с использованием замороженного гидролизата опухоли вместо свежей опухоли. Данные, полученные в ходе исследования, указывают на то, что нет разницы в экспрессии PD-1 при тестировании свежей или замороженной опухоли.

ВЫВОДЫ И РЕКОМЕНДАЦИИ

[002063] Процесс PD-1-отобранных TIL был разработан в полномасштабном варианте для экспансии PD-1+ TIL до > 80 e9 за 22 дня. Все шесть партий (метод окрашивания ниволумабом и EH12, 2 полномасштабных и 4 мелкомасштабных), произведенные в масштабе разработки, удовлетворяли критериям приемлемости для параметров выпуска.

Таблица 77: сводная таблица:

Параметры тестирования	**Критерий приемлемости**	**OV8074 (Ниволумаб)**	**OV8074 (EH12)**	**M1156 (Ниволумаб)**	**M1156 (EH12)**	**H3046 (Ниволумаб)**	**H3046 (EH12)**
Внешний вид	Пакет не поврежден, комочков нет	NA	NA	NA	NA	Соответствует	Соответствует
Жизнеспособность клеток	≥ 70%	Соответствует	Соответствует	Соответствует	Соответствует	Соответствует	Соответствует
Общее количество жизнеспособных клеток	от 1×10e9 до 150×10e9	Соответствует	Соответствует	Соответствует	Соответствует	Соответствует	Соответствует
Принадлежность (%CD45+/CD3+)	> 90% CD45+CD3+ клеток	Соответствует	Соответствует	Соответствует	Соответствует	Соответствует	Соответствует
IFNγ (стимулированные - нестимулированные)	≥ 500 пг/мл	Соответствует	Соответствует	Соответствует	Соответствует	Соответствует	Соответствует

NA - не применимо, клетки собирали в мелком масштабе.

[002064] В целом этот пример продемонстрировал, что PD-1-отобранные TIL, полученные из TIL, отсортированных по PD-1 с использованием ниволумаба, были сопоставимы с TIL, полученными с использованием клона EH12.2H7, что говорит в поддержку использования ниволумаба для отбора по PD-1 в клиническом производстве. См. также фиг. 162, 163 и 164.

ПРИМЕР 20: ОБЗОР ДОКЛИНИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ PD-1

ДОКЛИНИЧЕСКИЙ ОБЗОР

Введение

[002065] TIL, описанные в этом примере, представляли собой препарат аутологичных опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов (TIL), которые были отобраны на основе экспрессии биомаркера белка программируемой клеточной смерти-1 (PD-1). Таким образом, TIL представляли собой субпопуляцию, в которой TIL-клетки с более высокой экспрессией PD-1 были отобраны для экспансии *ex vivo*. Процесс производства, описанный в примерах, обеспечивает способ производства, в котором PD-1-положительные (PD-1$^+$) Т-клетки отбирают из общей массы популяции TIL с использованием проточной цитометрии перед их экспансией *ex vivo*. Полученные TIL были охарактеризованы, и их активность была продемонстрирована в исследованиях *ex vivo,* кратко изложенных ниже. Эти TIL можно вводить пациенту с использованием режима TIL для адоптивного переноса клеток (ACT), как описано в примерах и настоящей заявке.

[002066] В настоящем примере обобщены доклинические данные в поддержку клинического исследования фазы 2, в котором будет изучена безопасность и предварительная эффективность TIL у пациентов с плоскоклеточной карциномой головы и шеи (ПКГШ). Продукт TIL специфичен для пациента и не функционирует у разных видов, что исключает возможность его тестирования в традиционных доклинических фармакологических, фармакокинетических и токсикологических исследованиях. Доклиническая и клиническая безопасность других агентов, которые должны быть включены в режим лечения TIL (IL-2, циклофосфамид и флударабин), хорошо изучены.

[002067] Доклинические исследования, проведенные компанией Iovance в поддержку клинических исследований подвергнутого экспансии продукта TIL, перечислены в таблице 78. Отчеты для этих исследований представлены в примерах выше.

Таблица 78: список доклинических исследований

Заголовок отчета	Цели	Отчет №
Экспрессирующие PD-1 клетки в гидролизатах опухолей	Оценить распространенность PD-1$^+$ TIL в нескольких типах рака.	Пример 18
Экспансия PD-1-отобранных TIL	Продемонстрировать техническую осуществимость экспансии PD-1-отобранных TIL до адекватного количества клеток, используя	Пример 13

	процесс компании Iovance.	
Определение фенотипических характеристик PD-1-отобранных TIL	Охарактеризовать фенотип PD-1-отобранных TIL.	Пример 16
Анализ репертуара TCR PD-1-отобранных TIL	Сравнить репертуар TCR PD-1-отобранных и неотобранных продуктов TIL.	Пример 11
Реактивность против аутологичной опухоли в PD-1-отобранных TIL	Продемонстрировать опухолевую специфичность PD-1-отобранных TIL.	Пример 15
Исследование сопоставимости антитела EH12.2H7 и ниволумаба для отбора $PD1^+$ TIL	Установить эквивалентность исследуемого антитела и антитела GMP применительно к PD-1-отобранным клеткам	Пример 19

Доклиническое фармакологическое исследование

[002068] Отбор PD-1^+ TIL в процессе производства TIL перед экспансией *ex vivo* должен обеспечивать обогащение неоантиген-специфическими Т-клетки, сохраняя при этом разнообразие TIL и, следовательно, проявлять потенциал для распознавания ряда неоантигенов опухоли. Эта стратегия представляет собой привлекательное средство для дальнейшей оптимизации использования процесса производства TIL в лечении. На основе доклинических исследований, кратко изложенных ниже, был разработан процесс производства, который надежно генерирует высокофункциональный продукт PD-1-отобранных TIL.

[002069] Продукт PD-1-отобранных TIL будет исследован на предмет лечения рецидивирующего/рефрактерного НМРЛ - трудно поддающегося лечению злокачественного новообразования, для которого были проведены исследования в отношении корреляции между уровнями PD-1^+ клеток и клиническим исходом (Badoual et al., 2013).

Доклинические исследования

[002070] Продукт PD-1-отобранных TIL был всесторонне охарактеризован в отношении его состава и противоопухолевой активности *ex vivo*. Этим анализам предшествовало исследования нескольких типов опухолей на предмет инфильтрации PD-1^+ Т-клетками и тестирование процесса экспансии на отсортированных PD-1^+ TIL. Все доклинические исследования проводили с использованием моноклонального антитела к PD-1 (клон EH12.2H7) высокой чистоты для обнаружения и отбора PD-1^+ TIL. Поэтому было проведено промежуточное исследование для установления сопоставимости EH12.2H7 с ниволумабом - моноклональным антителом к PD-1, которое будет использоваться для

получения продукта TIL (см. пример 19). В целом, эта работа продемонстрировала, что PD-1-отобранные TIL были получен из множества гистологий опухолей; что они были фенотипически подобны неотобранным TIL; и что они демонстрируют многие качества, связанные со специфичностью к неоантигенам, включая изначально сниженную способность к пролиферации и, что важно, противоопухолевую реактивность.

Распространенность PD-1$^+$ TIL в нескольких типах рака (отчет № пример 18)

[002071] Присутствие PD-1$^+$ лимфоцитов оценивали в нескольких образцах опухолей из нескольких гистологий рака. В общей сложности были оценены 34 опухоли по следующим гистологиям: меланома (n=4), немелкоклеточный рак (НМРЛ) (n=7), ПКГШ (n=5), ОС (n=3), TNBC (n=4), РС (n=2) и CRC (n=8). Образцы CRC включали как микросателлитно-стабильные (MSS) опухоли (n=6), так и опухоли с микросателлитной нестабильностью (MSI) (n=2).

[002072] Образцы опухолей диссоциировали с использованием ферментативного гидролиза, и часть полученной суспензии отдельных клеток окрашивали на PD-1 и анализировали с помощью проточной цитометрии. Результаты исследований методом проточной цитометрии обобщены на фиг. 165.

[002073] Все проанализированные гидролизаты опухолей содержали значительную долю PD-1$^+$ клеток в популяции CD3$^+$ клеток. Процент PD-1$^+$ клеток варьировал от 11% до 78%, в среднем составляя 35% для исследованных гистологий. Меланома (n=4) и РС (n=2) дали самые низкие средние значения экспрессии PD-1: 27% и 21%, соответственно. Гистологии, которые, как было показано, в клиническом аспекте отвечают на блокаду анти-PD-1, такие как меланома и НМРЛ, не имели более высокого уровня/экспрессии PD-1, чем другие гистологии (т. е. ОС и РС).

[002074] Важно отметить, что PD-1-отобранный продукт мог быть получен после экспансии PD-1$^+$ клеток *ex vivo* во всех случаях, когда количество клеток до сортировки превышало 2×10^6, что было достигнуто в 12 из 13 образцов опухолей из исследованных гистологий. Результаты этого исследования обсуждаются в примере 13. Следовательно, на основе экспрессии PD-1 посредством TIL все проанализированные гистологии являются потенциальными кандидатами для приготовления продукта TIL.

Пролиферативная способность PD-1-отобранных TIL (пример 13)

[002075] Было показано, что клетки PD1+ нарушают продукцию цитокинов и снижают пролиферацию [3, 4]. Блокада PD-1 или его лиганда PD-L1 *in vivo* может восстановить функциональность этих клеток, связанную с вызыванием противоопухолевого ответа (Schmacher et al., 2015, Shang et al, 2018). Авторы проверили, можно ли обратить наблюдаемые дефекты в клетках PD-1$^+$ путем перемещения клеток из иммуносупрессивного микроокружения и экспансии клеток *ex-vivo* в присутствии антитела к CD3 и аллогенных фидеров, как описано в нескольких публикациях (Inozume et al., 2010; Thommen et al., 2018).

[002076] Чтобы определить, способны ли PD-1-отобранные TIL подвергаться экспансии *ex vivo* до больших количеств, PD-1-отобранные TIL из 4 образцов меланомы, 7

образцов опухоли НМРЛ и 2 образцов опухоли ПКГШ были подвергнуты процессу, представляющему собой двухэтапный протокол, состоящий из 11-дневного этапа активации, за которым следует 11-дневный протокол быстрой экспансии (REP), и оценены кратность их экспансии. Аналогичные неотобранные TIL, подвергнутые экспансии в аналогичных условиях из гидролизатов цельных опухолей, использовали в качестве контролей.

[002077] Пролиферативная способность PD-1-отобранных TIL была первоначально снижена по сравнению с неотобранными TIL, что приводило к более низким уровням экспансии на этапе активации. Средняя кратность экспансии для PD-1-отобранных TIL на этапе активации составила 833 по сравнению с 2650 для неотобранных TIL. Однако сопоставимые средние кратности экспансии, равные 1308 и 1418, были рассчитаны для PD-1-отобранных TIL и неотобранных TIL, соответственно, на этапе REP (фиг. 166).

[002078] Отсроченная экспансия на этапе активации в PD-1-отобранных TIL привела к более низкому общему выходу жизнеспособных клеток в 9 из 13 пар образцов (Таблица 79). Поскольку REP проводили в мелком масштабе, количество клеток, достижимое в производственном масштабе, оценивали на основе кратности экспансии REP и общего выхода клеток на этапе активации (т. е. экстраполированное количество клеток=кратность экспансии в REP * общий жизнеспособный выход активации). Следует отметить, что эти экстраполированные числа, вероятно, занижали потенциальный общий выход, поскольку для сортировки по PD-1 использовалась только часть клеточного гидролизата.

[002079] Экстраполированные выходы клеток дляPD-1-отобранных TIL варьировались от$2{,}32\times10^{7}$ до 209×10^{9}, со средним выходом клеток, равным $47{,}46\times10^{9}$ клеток. Важно отметить, что 12 из 13 культур, подвергнутых экспансии из PD-1-отобранных TIL, дали общие количества клеток после REP, которые находились в пределах диапазона, указанного для экспериментального препарата LN-145 (от 1×10^{9} до 150×10^{9} всех жизнеспособных клеток).

Таблица 79: выход готового продукта для PD-1-отобранных TIL

Идентификационный № опухоли	Название образца	Гистология	Количество высеянных клеток	Активация Кратность Экспансии	REP Кратность Экспансии	Экстраполированный выход (Количество клеток x 10^9)
H3035	PD-1-отобранные TIL	ПКГШ	11000	349,63	2165,75	8,29
	Неотобранные TIL			868,91	1385,80	13,2

H3039	PD-1-отобранные TIL	ПКГШ	13500	654,44	1082,50	9,56
	Неотобранные TIL			122,75	893,20	1,48
L4089	PD-1-отобранные TIL	НМРЛ	8134	1502,92	1416,93	16,9
	Неотобранные TIL			2820,88	2106,80	48,3
L4096	PD-1-отобранные TIL	НМРЛ	8000	581,75	788,10	3,67
	Неотобранные TIL			1749,00	919,20	12,9
L4097	PD-1-отобранные TIL	НМРЛ	47000	229,51	2455,30	26,5
	Неотобранные TIL			1146,81	1982,40	107
L4100	PD-1-отобранные TIL	НМРЛ	33000	536,45	996,60	17,6
	Неотобранные TIL			1498,09	899,50	44,5
L4101	PD-1-отобранные TIL	НМРЛ	99000	1346,46	895,90	209
	Неотобранные TIL			2196,11	962,20	119
L4104	PD-1-отобранные TIL	НМРЛ	70000	1711,00	1256,60	151
	Неотобранные			649,16	1421,00	64,6

	TIL					
L4106	PD-1-отобранные TIL	НМРЛ	18200	1178,57	1366,80	29,3
	Неотобранные TIL			4500,00	1912,85	157
M1132	PD-1-отобранные TIL	Меланома	2000	49,68	233,70	0,0232
	Неотобранные TIL			26705,00	1262,95	67,5
M1136	PD-1-отобранные TIL	Меланома	23500	960,77	867,20	19,6
	Неотобранные TIL			692,94	1190,40	19,4
M1139	PD-1-отобранные TIL	Меланома	10200	556,57	1750,53	9,94
	Неотобранные TIL			4907,79	1612,50	80,7
M1141	PD-1-отобранные TIL	Меланома	22400	3428,57	1514,75	116
	Неотобранные TIL			4950,00	2107,00	234

Обозначения: отсортированные по PD-1 и неотобранные TIL из 4 образцов меланомы, 7 образцов опухоли НМРЛ и 2 образцов опухоли HNSCC были подвергнуты экспансии с использованием 22-дневного процесса, состоящего из 11-дневного этапа активации с последующим 11-дневным REP. Показано количество высеянных $CD3^+$ клеток, кратность экспансии и экстраполированные количества клеток.

[002080] Таким образом, сниженная пролиферативная способность PD-1^+ TIL на этапе активации не препятствовала достижению продуктами PD-1-отобранных TIL высоких количеств клеток в готовом продукте. Фактически, 12 из 13 препаратов дали общее количество жизнеспособных клеток > 1×10^9 с использованием предлагаемого процесса производства подвергнутого экспансии продукта TIL. Эти выходы были в пределах тех,

которые указаны для выпуска стандартного экспериментального препарата LN-145.

Определение фенотипических характеристик PD-1-отобранных TIL (пример 16)

[002081] Анализы фенотипа проводили с помощью проточной цитометрии, чтобы охарактеризовать экспрессию маркеров клеточной поверхности линии Т-клеток и субпопуляции памяти. Кроме того, оценивали уровни PD-1 в PD-1-отобранных TIL. Тот же набор образцов из 13 соответствующих PD-1-отобранных и неотобранных продуктов TIL из 4 образцов меланомы, 7 образцов опухоли НМРЛ и 2 образцов опухоли ПКГШ были окрашены маркером live/dead с последующим окрашиванием антителами к нескольким маркерам. Результаты для CD4, CD8, CCR7, CD45RA и PD-1 представлены на фиг. 167, 168 и 169. Более подробные результаты, относящиеся к дополнительным маркерам активации, истощения, дифференцировки и пребывания в тканях, можно найти в полном отчете в примере 16.

Экспрессия CD4 и CD8 в PD-1-отобранных TIL

[002082] PD-1 в основном был охарактеризован в CD8+ Т-клетках, несмотря на его экспрессию в обеих линиях CD4+ и CD8+ (Ahmadzadeh et al., 2009; Inozume et al., 2010). Чтобы определить, изменяли ли отбор и экспансия PD-1$^+$ клеток долю CD4$^+$ и CD8$^+$ клеток, готовые продукты PD-1-отобранных TIL и продукты неотобранных TIL оценивали на предмет экспрессии CD4 и CD8 на клеточной поверхности.

[002083] Значительных различий в экспрессии CD4 и CD8 в продуктах PD-1-отобранных и неотобранных TIL, не наблюдалось (167). Доли CD4$^+$ и CD8$^+$ Т-клеток варьировали в разных образцах и гистологиях (отчет в примере 16), но в целом оба продукта TIL давали более высокую долю CD4$^+$ Т-клеток по сравнению с CD8$^+$ Т-клетками.

[002084] Сходство в экспрессии CD4 и CD8 в нескольких PD-1-отобранных и аналогичных неотобранных продуктах TIL дает основания полагать, что сортировка по PD-1 не влияет на линии Т-клеток готового подвергнутого экспансии продукта.

Популяции Т-клеток памяти в PD-1-отобранных TIL и неотобранных TIL

[002085] Опубликованные исследования показали, что PD-1+ TIL в основном состоят из Т-клеток эффекторной памяти (TEM) (Fernandez-Poma et al., 2017; Kansy et al., 2017). Кроме того, было показано, что эти TEM составляют основную популяцию продуктов неотобранных TIL, которые продемонстрировали клиническую активность (Gros et al., 2014). Субпопуляции Т-клеток памяти обычно различают с помощью следующих маркеров:

Т-клетки эффекторной памяти (TEM): CD45RA$^-$ и CCR7$^-$;

Т-клетки центральной памяти (TCM): CD45RA$^-$ и CCR7$^+$;

Наивные/стволовые Т-клетки памяти (TSCM): CD45RA$^+$ и CCR7$^+$; и

Эффекторные Т-клетки (TEMRA): CD45RA$^+$ и CCR7$^-$ (Golubovskaya and Wu, 2016).

[002086] Чтобы определить, состоят ли PD-1-отобранные TIL в основном из TEM, PD-1-отобранные и аналогичные неотобранные продукты TIL, полученные из 12 уникальных образцов опухолей, оценивали на предмет экспрессии CD45RA и CCR7 для определения индивидуальных субпопуляций памяти, указанных выше.

[002087] PD-1-отобранные и неотобранные продукты TIL состояли из аналогичных пропорций различных субпопуляций Т-клеток памяти, причем TEM-клетки составляли большинство клеток в каждом продукте (фиг. 168).

[002088] Учитывая схожую экспрессию фенотипических маркеров, связанных с памятью, отбор по PD-1 перед экспансией, по-видимому, не изменяет относительные пропорции субпопуляций Т-клеток памяти в продукте TIL. Следует отметить, что профиль субпопуляции Т-клеток памяти PD-1-отобранных TIL очень похож на профиль LN-145.

Экспрессия PD-1 в PD-1-отобранных TIL и неотобранных TIL

[002089] Экспрессия PD-1 в подвергнутых экспансии PD-1+ TIL, как было показано, снижается с культивированием и экспансией *ex vivo*, что интерпретируют как признак активизации TIL (Inozume et al., 2010; Thommen et al., 2018).

[002090] Чтобы определить, изменяется ли экспрессия PD-1 при экспансии, PD-1-отобранные и аналогичные неотобранные продукты TIL, полученные из 12 уникальных образцов опухолей, анализировали на предмет экспрессии PD-1 до и после экспансии.

[002091] Процент PD-1^+ клеток в неотобранных TIL до экспансии представляет собой популяцию клеток, экспрессирующих PD-1, в гидролизатах цельных опухолей (в среднем 37,3%). Как и ожидалось, сортировка на PD-1^+ клетки привела к получению высокочистой PD-1^+популяции со средней чистотой сортировки 92,8%. После экспансии экспрессия PD-1 была значительно снижена как в PD-1-отобранных, так и в неотобранных продуктах TIL по сравнению с уровнями PD-1 до экспансии. Более чем 3-кратное снижение доли PD-1^+ клеток наблюдалось как в PD-1-отобранных, так и в неотобранных препаратах TIL (фиг. 169).

[002092] PD-1-отобранные и неотобранные TIL также оценивали на предмет экспрессии дополнительных коингибирующих рецепторов, связанных с истощением. PD-1-отобранные TIL и неотобранные TIL экспрессировали схожие уровни TIM3, LAG3 и CD101 (пример 16).

[002093] Значительное снижение экспрессии PD-1 в TIL, которые экспрессировали высокие уровни PD-1 *in situ*, указывает на то, что эти клетки возвращаются к PD-1^- Т-клеткам при экспансии и, таким образом, с меньшей вероятностью будут подавлены осью PD-1/PD-L1 после инфузии.

[002094] Таким образом, фенотипический анализ PD-1-отобранных TIL выявил продукт, состоящий в основном из TEM-клеток с низкой экспрессией PD-1, что позволяет предположить, что эти клетки вновь активизировались после экспансии *ex vivo*.

Репертуар TCR PD-1-отобранных TIL (пример 11)

[002095] В исследовании на НМРЛ изучали, являются ли клоны TIL, экспрессирующие PD-1, обозначенные PD-1^T («опухолеассоциированный PD-1», т. е. уровни PD-1, превышающие уровни, наблюдаемые на МНПК здоровых доноров), общими с PD-1^- TIL. В то время как некоторое перекрытие клонов можно было наблюдать, преобладающие TCR в PD-1^T TIL не присутствовали в субпопуляции PD-1^- (Thommen et al., 2018). Низкая степень клонотипической общности клонов TCRvβ в PD-1^T и PD-1^- TIL дает

основания полагать, что продукты, полученные *ex vivo*, содержали TCR с различными антигенными специфичностями.

[002096] Ожидается, что этап отбора PD-1, проводимый перед фазой экспансии TIL *ex vivo,* приведет к получению продукта TIL, обогащенного опухолеспецифическими Т-клетками. Чтобы определить, образуют ли подвергнутые экспансии PD-1-отобранные TIL отличающийся продукт, PD-1-отобранные и неотобранные TIL сравнивали в части состава TCRvβ. С этой целью 10 лучших клонов TCRvβ, присутствующих в PD-1-отобранных продуктах TIL, оценивали на предмет их представленности в соответствующих аналогичных неотобранных продуктах TIL.

[002097] Во всех парах продуктов TIL большинство высоко представленных клонов PD-1-отобранных TIL либо присутствовали при значительно сниженных уровнях, либо не обнаруживались в аналогичном неотобранном продукте (фиг. 170).

[002098] PD-1-отобранные продукты TIL и неотобранные продукты TIL содержали разные TCR с высокой частотой встречаемости. Следовательно, можно ожидать, что эти два продукта будут демонстрировать измеримые различия в тестах *ex-vivo* на реактивность Т-клеток.

[002099] В целом, полученные авторами результаты демонстрируют, как этап отбора по PD-1 изменяет состав подвергнутого экспансии продукта TIL, и дают основания полагать, что получаемые PD-1-отобранные TIL могут быть значительно обогащены определенным репертуаром TCRvβ, который потенциально может иметь противоопухолевую реактивность.

[002100] Повышенная противоопухолевая реактивность PD-1-отобранных TIL (пример 15)

[002101] Опубликованные данные как на мышах, так и на людях продемонстрировали, что экспрессия PD-1 на Т-клетках внутри опухоли может идентифицировать репертуар опухолереактивных лимфоцитов, включая опухолевые неоантиген-специфические лимфоциты (Donia et al., 2017; Fernandez-Poma et al., 2017; Gros et al., 2014; Inozume et al., 2010; Jing et al., 2017; Thommen et al., 2018). В этих исследованиях была протестирована противоопухолевая реактивность *ex vivo* подвергнутых экспансии очищенных PD-1$^+$ TIL при совместном культивировании с аутологичными опухолевыми клетками, и было показано, что PD1$^+$ TIL секретируют значительно большие количества IFNγ, чем PD-1$^-$ TIL.

[002102] На основании этих исследований ожидается, что отбор TIL по экспрессии PD-1 приведет к обогащению опухоле-/неоантиген-специфическими Т-клетками, что должно продемонстрировать более высокую реактивность против аутологичной опухоли при оценке *ex-vivo*.

Противоопухолевая реактивность в PD-1-отобранных TIL

[002103] Чтобы оценить противоопухолевую реактивность TIL, измеряли высвобождение IFNγ с помощью ELISA при совместном культивировании с гидролизатами аутологичных опухолей.

[002104] Из 10 пар оцененных PD-1-отобранных и неотобранных продуктов TIL (соответствующих 5 из 13 образцов опухолей, на которых сосредоточен данный обзор, дополненных 5 недавно полученными образцами), 7 продуцировали обнаружимые количества IFNγ при совместном культивировании с гидролизатами аутологичных опухолей. Три пары (2 опухоли яичника и 1 TNBC) не продуцировали IFNγ при любых условиях, при совместном культивировании. В 7 поддающихся оценке совместных культурах PD-1-отобранные TIL продуцировали значительно более высокие уровни IFNγ, чем их неотобранные аналоги, в среднем в 4,57 раза больше (от 1,22 до 11,65) (Фиг. 171). Для 5 из 7 отвечающих PD-1-отобранных TIL эта повышенная реактивность была антиген-специфичной, что было продемонстрировано снижением продукции IFNγ при блокаде HLA класса I. Как показано на диаграмме, положительные значения отражают HLA-специфические противоопухолевые ответы, а нулевые или отрицательные значения отражают неспецифические ответы.

[002105] Таким образом, отбор экспрессирующих PD-1 TIL привел к получению продуктов TIL, обогащенных опухолереактивными Т-клетками.

[002106] Увеличенная продукция IFNγ в присутствии аутологичной опухоли указывает на то, что PD-1-отобранные TIL могут иметь больший потенциал противоопухолевых эффектов по сравнению с неотобранными TIL при введении пациентам в условиях ACT. Клиническая эффективность ACT напрямую связана с наличием опухолеспецифических TIL. Следовательно, обогащение опухолеспецифическими TIL посредством отбора по PD-1 и экспансии может повысить способность TIL инициировать мощный и эффективный противоопухолевый эффект при введении пациентам.

Уничтожение аутологичных опухолевых клеток

[002107] Десять согласованных PD-1-отобранных TIL и неотобранных TIL оценивали на предмет уничтожения аутологичных опухолей. Лизис опухолевых клеток количественно оценивали с помощью анализа клеток в режиме реального времени xCELLigence, который отслеживает отделение опухолевых клеток как меру гибели опухолевых клеток (Peper et al., 2014)

[002108] Из 10 оцененных опухолей только 1 опухоль меланомы могла быть оценена на цитолиз опухоли из-за плохого прикрепления опухолевых клеток и низкой жизнеспособности. Лизис опухолевых клеток оценивали с помощью индекса опухолевых клеток, который представляет собой меру импеданса планшета, когда клетки прикрепляются к нему или отделяются от него. Если в любой момент совместного культивирования клеточный индекс упадет ниже нуля, цитолиз для этого образца не сможет быть рассчитан. В 9 из 10 протестированных опухолей клеточный индекс упал ниже нуля, что привело к невозможности надлежащей оценки цитолиза опухоли.

[002109] В подлежащей оценке опухоли PD-1-отобранные TIL продемонстрировали более высокую способность к уничтожению аутологичной опухоли, что определялось большим падением клеточного индекса - параметра, который отражает пролиферацию клеток при увеличении и отделение/гибель клеток при уменьшении, - а также более

высокий процент цитолиза по сравнению с неотобранными TIL (фиг. 172).

[002110] Результаты этого анализа показывают, что PD-1-отобранные TIL обладали большей способностью к уничтожению аутологичной опухоли по сравнению с их неотобранными аналогами. Этот результат согласуется с опубликованными отчетами о превосходной противоопухолевой активности как свежевыделенных, так и подвергнутых экспансии *ex vivo* PD-1$^+$ TIL по сравнению с PD-1$^-$ TIL (Gros et al., 2014; Inozume et al., 2010). Аналогичное наблюдение было сделано для PD-1$^+$ TIL, выделенных из НМРЛ, что дает основания полагать, что обнаружение не является специфичным для меланомы (Thommen et al., 2018).

Эквивалентность EH12.2H7 и ниволумаба для отбора PD1$^+$ TIL (пример 19)

[002111] Для установления эквивалентности сравнивали PD-1-отобранные TIL, полученные в результате сортировки PD-1$^+$ с использованием исследуемого моноклонального антитела (EH12.2H7) и моноклонального антитела GMP (ниволумаба) к PD-1. Для идентификации PD-1$^+$ популяции три гидролизата опухоли (1 яичника, 1 меланома и 1 ПКГШ) окрашивали либо с помощью EH12.2H7, либо с помощью ниволумаба. PD-1$^+$ клетки, отсортированные с помощью ниволумаба и EH12.2H7, были подвергнуты экспансии с использованием двухэтапного процесса, который включал 11-дневный этап активации и 11-дневный REP, в течение в общей ложности 22 дней.

[002112] В целом эта работа продемонстрировала, что PD-1-отобранные TIL, полученные из TIL, отсортированных по PD-1 с использованием ниволумаба, были сопоставимы с TIL, полученными с использованием клона EH12.2H7, что говорит в поддержку использования ниволумаба для отбора по PD-1 в производстве подвергнутого экспансии экспериментального продукта TIL.

Экспансия *ex vivo* PD-1-отобранных TIL с использованием ниволумаба и EH12.2H7

[002113] Чтобы определить, имели ли PD-1-отобранные TIL, полученные с использованием ниволумаба и EH12.2H7, аналогичную пролиферацию, PD-1-отобранные TIL из 1 опухоли яичника, 1 меланомы и 1 ПКГШ подвергали 11-дневному этапу активации, а затем 11-дневному этапу REP, и оценивали выход и экспансию.

[002114] Гидролизаты опухолей, окрашенные EH12.2H7 и ниволумабом, экспрессировали аналогичные уровни CD3$^+$ PD-1$^+$ клеток и выглядели как неразличимые точечные графики на проточном цитометре (фиг. 172 и таблица 79). Кратность экспансии на этапе активации и REP, а также общий экстраполированный/фактический выход клеток были аналогичными при сравнении двух популяций TIL.

[002115] Таким образом, EH12.2H7 и ниволумаб идентифицировали аналогичный процент PD-1$^+$ клеток в гидролизатах опухолей. Кратности экспансии TIL и общее экстраполированное количество клеток в трех образцах опухолей, окрашенных ниволумабом и EH12.2H7, были сопоставимыми.

Определение фенотипических характеристик PD-1-отобранных TIL, созданных с использованием EH12.2H7 и ниволумаба для сортировки по PD-1$^+$

[002116] PD-1-отобранные TIL, полученные с использованием EH12.2H7 и

ниволумаба для получения PD-1$^+$ TIL, оценивали на предмет экспрессии CD4, CD8, CCR7, CD45RA и PD-1 с помощью проточной цитометрии. Более обширную фенотипическую оценку можно увидеть в примере 19.

[002117] Никаких значимых различий в экспрессии CD4 и CD8 в PD-1-отобранных клетках, полученных с использованием ниволумаба и EH12.2H7, не наблюдалось. Для трех исследованных опухолей оба продукта TIL давали более высокую долю CD8$^+$ Т-клеток по сравнению с CD4$^+$ Т-клетками (фиг. 174).

[002118] Сходство экспрессии CD4 и CD8 в трех продуктах PD-1-отобранных TIL указывает на то, что отбор по PD-1+ с использованием ниволумаба не изменил соотношение CD4/CD8 по сравнению с EH12.2H7.

[002119] Как и линия Т-клеток, статус памяти TIL был схожим в PD-1-отобранных TIL, полученных с использованием EH12.2H7 и ниволумаба. Популяции TIL состояли преимущественно из Т-клеток эффекторной памяти (фиг. 175).

[002120] PD-1-отобранные TIL, полученные с использованием ниволумаба и EH12.2H7, похожи на экспериментальный препарат LN-145, что дает основания полагать, что отбор по PD-1 с использованием любого клона к PD-1 не искажает фенотип памяти TIL.

[002121] Чтобы оценить, снижалась ли экспрессия PD-1 аналогичным образом при культивировании, PD-1-отобранные TIL, полученные с использованием ниволумаба и EH12.2H7, оценивали до и после экспансии. После сортировки процентное содержание PD-1+ TIL было близко к 100% в обоих свежеотсортированных препаратах TIL (таблица 79). Экспрессия PD-1 была значительно и сравнительно снижена после экспансии в PD-1-отобранных клетках, полученных с использованием EH12.2H7 и ниволумаба (фиг. 176).

[002122] Как обсуждается на фиг. 169, снижение экспрессии PD-1 при экспансии подтверждает, что PD-1+ отсортированные TIL с использованием EH12.2H7 и ниволумаба с экспансией в основном возвращаются в PD-1-. Функциональная характеристика PD-1-отобранных TIL, полученных из PD-1+ TIL, отсортированных с помощью EH12.2H7 и ниволумаба

[002123] Чтобы оценить, были ли подвергнутые экспансии PD-1+ TIL, полученные с использованием ниволумаба, аналогичны функциональным TIL, полученным с использованием клона EH12.2H7, PD-1-отобранные TIL из 3 опухолей неспецифически стимулировали с помощью активирующих гранул αCD3/αCD28/α41BB и оценивали на предмет секреции IFNγ и гранзима B.

[002124] PD-1-отобранные TIL, полученные с использованием ниволумаба и EH12.2H7, продуцировали аналогичные уровни IFNγ и гранзима B в ответ на стимуляцию (фиг. 177).

[002125] PD-1-отобранные TIL, полученные с использованием ниволумаба и EH12.2H7, секретировали заметные уровни IFNγ и гранзима B в ответ на неспецифическую стимуляцию (гранулы αCD3/αCD28/αCD137), что дает основания полагать, что отобранные TIL были в высокой степени функциональными после экспансии.

Выводы

[002126] Таким образом, PD-1$^+$ TIL были получены из всех 34 протестированных образцов опухолей, которые включали образцы CRC, НМРЛ, ПКГШ, TNBC, меланомы, ОС и РС. Процент TIL, экспрессирующих высокие уровни PD-1, варьировал в пределах данного типа опухоли и не коррелировал у различных типов опухолей с известной клинической восприимчивостью к терапии против PD-1.

[002127] Важно отметить, что прогнозируемый выход PD-1-отобранных TIL после экспансии *ex vivo* находился в пределах диапазона клинических доз, установленного для экспериментального препарата LN-145. Более того, фенотип подвергнутых экспансии PD-1-отобранных TIL был схож с аналогичными неотобранными продуктами TIL, а также с фенотипом, проявляемым препаратами LN-145, хотя PD-1-отобранные продукты TIL сохраняли уровни экспрессии PD-1 от низких до умеренных.

[002128] Наконец, PD-1-отобранные продукты TIL продемонстрировали превосходную реактивность в отношении аутологичных опухолей и уничтожение опухолевых клеток по сравнению с аналогичными неотобранными TIL. Это наблюдение согласуется с резким обогащением наиболее распространенными последовательностями TCRvβ в PD-1-отобранных продуктах по сравнению с уровнями этих последовательностей в аналогичных неотобранных продуктах TIL. Усиленная противоопухолевая реактивность была ожидаемой из-за опубликованных исследований, демонстрирующих, что неоантиген-реактивные Т-клетки, полученные из опухолей, экспрессируют PD-1 (6, 8).

[002129] Обобщенные доклинические исследования PD-1-отобранных TIL убедительно говорят в пользу клинической разработки подвергнутого экспансии продукта TIL для АСТ солидных опухолей.

ЦИТИРУЕМЫЕ ИСТОЧНИКИ ДЛЯ ПРИМЕРА 20

Ahmadzadeh M, Johnson LA, Heemskerk B, Wunderlich JR, Dudley ME, White DE and Rosenberg SA (2009) Tumor antigen-specific CD8 T cells infiltrating the tumor express high levels of PD-1 and are functionally impaired. *Blood* **114**:1537-1544.

Badoual C, Hans S, Merillon N, Van Ryswick C, Ravel P, Benhamouda N, Levionnois E, Nizard M, Si-Mohamed A, Besnier N, Gey A, Rotem-Yehudar R, Pere H, Tran T, Guerin CL, Chauvat A, Dransart E, Alanio C, Albert S, Barry B, Sandoval F, Quintin-Colonna F, Bruneval P, Fridman WH, Lemoine FM, Oudard S, Johannes L, Olive D, Brasnu D and Tartour E (2013) PD-1-expressing tumor-infiltrating T cells are a favorable prognostic biomarker in HPV-associated head and neck cancer. *Cancer Res* **73**:128-138.

Barber DL, Wherry EJ, Masopust D, Zhu B, Allison JP, Sharpe AH, Freeman GJ and Ahmed R (2006) Restoring function in exhausted CD8 T cells during chronic viral infection. *Nature* **439**:682-687.

Chikuma S, Terawaki S, Hayashi T, Nabeshima R, Yoshida T, Shibayama S, Okazaki T and Honjo T (2009) PD-1-mediated suppression of IL-2 production induces CD8+ T cell anergy in vivo. *J Immunol* **182**:6682-6689.

Donia M, Kjeldsen JW, Andersen R, Westergaard MCW, Bianchi V, Legut M, Attaf M, Szomolay B, Ott S, Dolton G, Lyngaa R, Hadrup SR, Sewell AK and Svane IM (2017) PD-1(+)

Polyfunctional T Cells Dominate the Periphery after Tumor-Infiltrating Lymphocyte Therapy for Cancer. *Clin Cancer Res* **23**:5779-5788.

Fernandez-Poma SM, Salas-Benito D, Lozano T, Casares N, Riezu-Boj JI, Mancheno U, Elizalde E, Alignani D, Zubeldia N, Otano I, Conde E, Sarobe P, Lasarte JJ and Hervas-Stubbs S (2017) Expansion of Tumor-Infiltrating CD8(+) T cells Expressing PD-1 Improves the Efficacy of Adoptive T-cell Therapy. *Cancer Res* **77**:3672-3684.

Geukes Foppen MH, Donia M, Svane IM and Haanen JB (2015) Tumor-infiltrating lymphocytes for the treatment of metastatic cancer. *Mol Oncol* **9**:1918-1935.

Golubovskaya V and Wu L (2016) Different Subsets of T Cells, Memory, Effector Functions, and CAR-T Immunotherapy. *Cancers (Basel)* **8**.

Gros A, Robbins PF, Yao X, Li YF, Turcotte S, Tran E, Wunderlich JR, Mixon A, Farid S, Dudley ME, Hanada K, Almeida JR, Darko S, Douek DC, Yang JC and Rosenberg SA (2014) PD-1 identifies the patient-specific CD8(+) tumor-reactive repertoire infiltrating human tumors. *J Clin Invest* **124**:2246-2259.

Inozume T, Hanada K, Wang QJ, Ahmadzadeh M, Wunderlich JR, Rosenberg SA and Yang JC (2010) Selection of CD8+PD-1+ lymphocytes in fresh human melanomas enriches for tumor-reactive T cells. *J Immunother* **33**:956-964.

Jing W, Gershan JA, Blitzer GC, Palen K, Weber J, McOlash L, Riese M and Johnson BD (2017) Adoptive cell therapy using PD-1(+) myeloma-reactive T cells eliminates established myeloma in mice. *J Immunother Cancer* **5**:51.

Kansy BA, Concha-Benavente F, Srivastava RM, Jie HB, Shayan G, Lei Y, Moskovitz J, Moy J, Li J, Brandau S, Lang S, Schmitt NC, Freeman GJ, Gooding WE, Clump DA and Ferris RL (2017) PD-1 Status in CD8(+) T Cells Associates with Survival and Anti-PD-1 Therapeutic Outcomes in Head and Neck Cancer. *Cancer Res* **77**:6353-6364.

McGranahan N, Furness AJ, Rosenthal R, Ramskov S, Lyngaa R, Saini SK, Jamal-Hanjani M, Wilson GA, Birkbak NJ, Hiley CT, Watkins TB, Shafi S, Murugaesu N, Mitter R, Akarca AU, Linares J, Marafioti T, Henry JY, Van Allen EM, Miao D, Schilling B, Schadendorf D, Garraway LA, Makarov V, Rizvi NA, Snyder A, Hellmann MD, Merghoub T, Wolchok JD, Shukla SA, Wu CJ, Peggs KS, Chan TA, Hadrup SR, Quezada SA and Swanton C (2016) Clonal neoantigens elicit T cell immunoreactivity and sensitivity to immune checkpoint blockade. *Science* **351**:1463-1469.

Peper JK, Schuster H, Loffler MW, Schmid-Horch B, Rammensee HG and Stevanovic S (2014) An impedance-based cytotoxicity assay for real-time and label-free assessment of T-cell-mediated killing of adherent cells. *J Immunol Methods* **405**:192-198.

Schumacher TN and Schreiber RD (2015) Neoantigens in cancer immunotherapy. *Science* **348**:69-74.

Shang J, Song Q, Yang Z, Sun X, Xue M, Chen W, Yang J and Wang S (2018) Analysis of PD-1 related immune transcriptional profile in different cancer types. *Cancer Cell Int* **18**:218.

Thommen DS, Koelzer VH, Herzig P, Roller A, Trefny M, Dimeloe S, Kiialainen A, Hanhart J, Schill C, Hess C, Savic Prince S, Wiese M, Lardinois D, Ho PC, Klein C, Karanikas V, Mertz KD, Schumacher TN and Zippelius A (2018) A transcriptionally and functionally distinct

PD-1(+) CD8(+) T cell pool with predictive potential in non-small-cell lung cancer treated with PD-1 blockade. *Nat Med.*

ПРИМЕР 21: ОТБОР И ЭКСПАНСИЯ PD-1HIGH ДЛЯ ПРОИЗВОДСТВА

ВВЕДЕНИЕ

[002130] Несколько исследований продемонстрировали, что поверхностная экспрессия высоких уровней PD-1 - маркера, часто связанного с истощением Т-клеток, является отличительным признаком аутологичных опухолереактивных Т-клеток в микроокружении опухоли (раздел 11.10). В этом примере представлен протокол, разработанный для отбора PD-1-положительных (PD-1+) клеток из гидролизатов опухолей для обогащения продукта TIL аутологичными опухолереактивными Т-клетками (пример 15). Этот протокол был адаптирован для селективного получения TIL с высокими уровнями PD-1.

ЦЕЛЬ

[002131] Целью этого примера было разработать процесс сортировки и экспансии PD-1^{High} TIL для производства материала для клинических исследований.

ОБЛАСТЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

[002132] В примере показаны подвергнутые экспансии отсортированные PD-1^{High} TIL из меланомы, опухолей легких и головы и шеи с использованием протокола 2-REP, разработанного для полномасштабного клинического производства.

[002133] Три полномасштабные отобранные культуры PD-1^{High} Gen 2 были подвергнуты экспансии, как описано ниже.

[002134] В день 0 выделяли гидролизат опухоли с использованием коктейля для гидролиза GMP, содержащего нейтральную протеазу, ДНКазу I и коллагеназу. Гидролизат промывали, окрашивали и сортировали с помощью FACS для очистки PD-1^{High} TIL.

[002135] REP-1 инициировали в день 0 с использованием отсортированных PD-1^{High} TIL с 100e6 аллогенных фидерных клеток и 30 нг/мл OKT3 в течение 11 дней.

[002136] REP-2 инициировали на день 11 с использованием собранного продукта REP-1. REP-2 (день 11) и последующие процессы в день 16 и день 22 выполнялись в соответствии с протоколами производства партий IOVA (см. приложения к разделу 12). Краткое объяснение связанных временных точек приведено ниже.

[002137] Подвергнутые экспансии TIL оценивали на рост клеток, жизнеспособность, фенотип, длину теломер и функцию (секреция IFNγ и гранзима B, мобилизация CD107a).

[002138] МЕТОДЫ

[002139] Материалы

[002140] Опухолевая ткань

[002141] Опухоли различной гистологии будут получены от исследовательских альянсов и поставщиков тканей.

[002142] Стандартные реагенты для выращивания TIL, которые включают: колбы G-Rex 100MCS и 500 MCS (Wilson Wolf, № по каталогу 81100-CS, 85500S-CS, соответственно); рекомбинантный IL-2 GMP (Cell-Genix, Германия, № по каталогу 1020-

1000); все реагенты для сред CM1, CM2 и CM4 можно найти в протоколе производства партии, как показано в приложениях 5-7; GlutaMAX 100X (Thermofisher, № по каталогу 35050061); и гентамицин 50 мг/мл (Thermofisher, № по каталогу 15750060).

[002143] Реагенты для окрашивания в проточной цитометрии и анализа

[002144] Антитела для проточной цитометрии: анти-PD-1 PE, клон EH12.2H7, Biolegend, № по каталогу 329906; анти-CD3 FITC, клон OKT3, Biolegend, № по каталогу 317306; и анти-IgG4 Fc-PE, клон HP6025, Southern Biotech, № по каталогу 9200-09.

[002145] Сортировочный буфер: HBSS с 2% FBS, 1 мМ EDTA и подвергнутый стерилизующей фильтрации в Gemini.

[002146] Буфер для сбора: HBSS с 50% сыворотки hAB.

ПРОЦЕДУРА

Подготовка опухолевой ткани

[002147] Свежерезецированные образцы опухолей будут получены от исследовательских альянсов и поставщиков тканей. Опухоли отправляют срочной доставкой в HypoThermosol (Biolife Solutions, Вашингтон, № по каталогу 101104) (с антибиотиком).

[002148] Делали фото опухоли во флаконе/пробирке. Вынимали опухоль из упаковки и промывали 3 раза в течение 2 минут для каждой промывки в буфере для промывки опухолей (отфильтрованный HBSS с 50 мкг/мл гентамицина).

[002149] Фрагментировали всю опухоль на фрагменты размером 4-6 мм для подготовки для гидролиза опухоли. Хранили фрагменты размером 6 мм в лунке 6-луночного планшета, содержащего 10 мл буфера для промывки опухолей.

Ферментный препарат для гидролиза опухолей

[002150] Опухоль подвергали гидролизу с использованием коллагеназы GMP и нейтральной протеазы, как описано ниже.

[002151] Лиофилизированные ферменты восстанавливали в количестве стерильного HBSS, указанном для каждого из ферментов для гидролиза, указанных ниже. Обязательно собирают остатки порошка со стенок бутылок и с защитной пленки на горлышках бутылок. Несколько раз переливали пипеткой, а также вращали, чтобы обеспечить полное восстановление.

[002152] Восстанавливали коллагеназу AF-1 (Nordmark, Швеция, N0003554) в 10 мл стерильного HBSS. Лиофилизированный исходный препарат фермента имеет концентрацию 2892 PZ-Ед/флакон. Таким образом, после восстановления исходный препарат коллагеназы имел концентрацию 289,2 PZ-Ед/мл. **Следует обратить внимание, что исходный раствор ферментов может измениться, поэтому необходимо проверять концентрацию лиофилизированного исходного препарата и соответствующим образом изменять окончательное количество фермента, добавляемого в коктейль для гидролиза**. Отмеряли аликвоты по 100 мкл и хранили при -20 °C.

[002153] Восстанавливали нейтральную протеазу (Nordmark, Швеция, N0003553) в 1 мл стерильного HBSS. Лиофилизированный исходный препарат фермента имел

концентрацию 175 DMC-Ед/флакон. Таким образом, после восстановления исходный препарат нейтральной протеазы имел концентрацию 175 DMC-Ед/мл. **Следует обратить внимание, что исходный раствор ферментов может измениться, поэтому необходимо проверять концентрацию лиофилизированного исходного препарата и соответствующим образом изменять окончательное количество фермента, добавляемого в коктейль для гидролиза**. Отмеряли аликвоты по 20 мкл и хранили при -20 °C.

[002154] Восстанавливали ДНКазу I (Roche, Швейцария, 03724751) в 1 мл стерильного HBSS. Лиофилизированный исходный препарат фермента имел концентрацию 4K-Ед/флакон. Таким образом, после восстановления исходный препарат ДНКазы имел концентрацию 4K-Ед/флакон. **Следует обратить внимание, что исходный раствор ферментов может измениться, поэтому необходимо проверять концентрацию лиофилизированного исходного препарата и соответствующим образом изменять окончательное количество фермента, добавляемого в коктейль для гидролиза**. Отмеряли аликвоты по 250 мкл и хранили при -20 °C.

[002155] Размораживали 3 компонента коктейля для гидролиза GMP и готовили рабочий коктейль для гидролиза GMP следующим образом: добавляли 10,2 мкл нейтральной протеазы (0,36 DMC-Ед/мл), 21,3 мкл коллагеназы AF-1 (1,2 PZ/мл) и 250 мкл ДНКазы I (200 Ед/мл) на 4,7 мл стерильного HBSS. Помещали коктейль для гидролиза непосредственно в C-tube.

Обработка опухолей и гидролиз

[002156] В GentleMACS OctoDissociator переносили фрагменты опухоли размером до 4-6 мм в каждую пробирку C-Tube от GentleMACS (C-tube) в 5 мл коктейля для гидролиза, указанного выше. Использовали дополнительную трубку GentleMACS C-Tube для дополнительных фрагментов опухоли.

[002157] Переносили каждую C-tube в GentleMACS OctoDissociator. Проводили гидролиз путем настройки гомогенизатора на соответствующую программу для соответствующей гистологии опухоли из перечисленных ниже в таблице 80. Диссоциация длится примерно один час.

Таблица 80. Программы OctoDissociator от Miltenyi в зависимости от типа опухолевой ткани.

Тип опухолевой ткани	Обозначение	Программа
Меланома, рак яичника, ободочной кишки, гипофарингеальный рак и рак почки	Мягкий	37C_h_TDK_1
Рак легкого и предстательной железы	Средний	37C_h_TDK_2
Рак молочной железы, поджелудочной железы,	Жесткий	37C_h_TDK_3

гепатоклеточный рак, плоскоклеточная карцинома головы и шеи (ПКГШ)		

[002158] После гидролиза извлекали пробирку(и) C-tube из Octodissociator или встряхивателя и помещали ее в BSC. С помощью серологической пипетки на 25 мл удалили гидролизат из каждой C-tube и пропускали основной продукт гидролиза через клеточное сито на 70 мкм в коническую пробирку на 50 мл. Не претерпевшие гидролиз части опухоли могут не проходить через клеточное сито, не допускайте разбрызгивания гидролизата из-за давления пипеточного дозатора. Промывали пробирку(и) C-tube дополнительными 10 мл HBSS и пропускали смыв через клеточное сито. Наливали в коническую пробирку на 50 мл HBSS до достижения 50 мл.

[002159] Центрифугировали гидролизат при 400 x G в течение 5 минут при комнатной температуре (полное ускорение и полная остановка).

[002160] Переносили содержимое конической пробирки в BSC и аспирировали или сливали супернатант. Ресуспендировали осадок в 5 мл теплой CM-1+6000 МЕ/мл IL-2 и перемешивали, переливая пипеткой 5-6 раз. Проводили 2 подсчета клеток на NC-200 без разведения согласно WRK LAB-056

[002161] Откладывали 1 мл гидролизата в сторону для контроля CD3+ общей массой и криоконсервировали 2 аликвоты по 500 мкл гидролизата для анализов противоопухолевой реактивности. Держали гидролизат на льду.

Окрашивание гидролизованной опухоли для анализа методом проточной цитометрии и сортировки клеток

[002162] Откладывали небольшой образец (~1e5 клеток) для одноцветного компенсационного контроля PE и FITC в конические пробирки на 15 мл.

[002163] Оставшийся гидролизат опухоли окрашивали коктейлем, включавшим анти-PD-1-PE, анти-IgG4 Fc-PE (вторичное антитело к ниволумабу и пембролизумабу) и анти-CD3-FITC в соответствии со следующим протоколом. Контрольный образец компенсации цвета PE окрашивали анти-PD-1-PE и вторичным IgG4, а цветной компенсационный контроль FITC окрашивали только анти-CD3-FITC.

[002164] После подсчета клеток добавляли 10 мл HBSS для гидролиза и центрифугировали при 400 x G в течение 5 минут при комнатной температуре (полное ускорение и полная остановка).

[002165] Переносили содержимое конической пробирки в BSC и ***сливали*** супернатант. Использовали микропипетку, чтобы получить объем гидролизата, оставшийся после сливания. Добавляли в пробирку в 3 раза превышающий его объем сортировочного буфера, т. е. если полученный объем составляет 150 мкл, добавляют 450 мкл сортировочного буфера, чтобы общий объем составил 600 мкл.

[002166] Добавляли 3 мкл анти-CD3-FITC на 100 мкл (т. е. если объем составляет 600 мкл, добавляют 6 x 3=18 мкл антитела). ***(Добавляют к обоим образцам).***

[002167] Добавляли 2,5 мкл анти-PD-1-PE на 100 мкл (т. е. если объем составляет 600 мкл, добавляют 6 x 2,5=15,0 мкл антитела). ***(Не добавлять к FMO).***

[002168] Добавляли анти-IgG4-Fc-PE в разведении 1:500 (т. е. на каждые 500 мкл объема добавляли 1 мкл антитела).

[002169] Осторожно перемешивали гидролизат с помощью микропипетки на 1 мл и инкубировали клетки на льду в течение 30 минут. Защищали от света во время инкубации. Во время инкубации осторожно встряхивали каждые 10 минут для обеспечения однородного окрашивания.

[002170] Ресуспендировали полностью окрашенные клетки в 10 мл сортировочного буфера, добавляли 10 мл сортировочного буфера к FMO.

[002171] Пропустили полностью окрашенный раствор через клеточное сито на 30 мкм в коническую пробирку на 15 мл, FMO также пропустили через клеточное сито на 30 мкм в коническую пробирку на 15 мл.

[002172] Центрифугировали при 400 x G в течение 5 мин при комнатной температуре (полное ускорение и полная остановка).

[002173] Ресуспендировали клетки в количестве до 10e6/мл всех клеток (живых и мертвых) в сортировочном буфере. Минимальный объем составляет 300 мкл.

[002174] Переносили в конические пробирки на 15 мл. Хранили пробирки на льду, накрытыми алюминиевой фольгой, до дальнейшего использования.

[002175] Подготавливали пробирки на 15 мл для сбора отсортированных популяций. Помещали в пробирки 2 мл буфера для сбора (D-PBS с 2% сыворотки hAB). Хранили пробирки для сбора на льду до дальнейшего использования.

Подсчет клеток и оценка жизнеспособности

[002176] Использовали процедуры для подсчета клеток и определения жизнеспособности с использованием счетчика клеток Chemometec NC-200

[002177] Сортировка методом FACS (запуск FX500)

[002178] Включали BSC. Включали вакуумный насос JUN-AIR. Включали FX500, нажав кнопку питания/ожидания на передней панели прибора. Открыли программу Cell Sorter, дважды щелкнув по иконке на рабочем столе, вошли в систему и запустили программу.

[002179] Проведение автоматической калибровки

[002180] Когда было предложено загрузить калибровочные гранулы, добавили 15 капель гранул для автоматической настройки в стерильную пробирку для FACS на 5 мл. Затем следовали подсказкам. Когда было предложено выбрать настройки для автоматической калибровки, выбрали переключатель «Стандарт». В ожидании завершения калибровки подготовили следующее: подготовили пять стерильных конических пробирок на 15 мл с 10 мл стерильной деионизированной воды; подготовили пять стерильных пробирок для FACS на 5 мл с 4 мл стерильной деионизированной воды; подготовили пять стерильных конических пробирок на 15 мл с 12 мл 70% этанола; и подготовили пять стерильных конических пробирок на 15 мл с 12 мл 10% гипохлорита натрия.

Сбор образцов

[002181] Убедились, что камеры для образцов и сбора находились при 5 °C, и что была выбрана иконка перемешивания образца. Щелкнули по вкладке «Cytometer» в верхней части экрана. Щелкнули на иконку «Collection» 5°C, а также на иконку «Sample» 5°C. Щелкнули по иконке «Agitate».

[002182] Убедились, что образцы компенсированы. Щелкнули по вкладке «Compensation» вверху экрана. Значок компенсации должен быть голубого цвета. Поместили пробирку, содержащую контроль МНПК (либо пробирку для FACS на 5 мл, либо коническую на 15 мл), на платформу для сбора образцов. Установили давление отбора пробы на 6. Щелкнули кнопку воспроизведения, чтобы начать сбор образцов. Щелкнули по таблице «Gates and Statistics» («Гейты и статистика»), чтобы в верхней части экрана отобразилось следующее.

[002183] Выбрано 100000 для обоих выпадающих меню, показанных выше. Проверено, что клеточные популяции правильно гейтированы. См. пример ниже. Могло потребоваться отрегулировать настройки BSC или FSC. Напряжения для других каналов не регулируют. Гейт для PD-1 не регулировали. Зарегистрировали как можно больше событий (или максимум 20000 событий CD3). Вы можете установить давление образца на 10, чтобы ускорить сбор. Останавливали сбор и вынимали пробирку. На платформу для образцов загружали коническую пробирку на 15 мл со стерильным dH20, изготовленным ранее. Выбирали 10 для давления образца. Щелкнули по иконке «Run». Собирали образец за одну минуту. Щелкнули по иконке «Restart». Повторяли до тех пор, пока в гейте CD3 не осталось событий. Вынимали пробирку с dH20 и отбрасывали. Добавляли образец для сбора на погрузочную платформу. Проверяли, что настройки соответствуют показанным на диаграмме ниже:

[002184] Открывали дверцу камеры для образцов и загружали в нее блок камеры для сбора на 15 мл. Загружали пробирки для сбора, содержащие буфер для сбора, в блок камеры. Несколько раз переворачивали закрытые пробирки, чтобы покрыть верх пробирки буфером для сбора. Постукивали пробирками по поверхности BSC, чтобы удалить излишки буфера с верхней части пробирки и крышки. Промаркировали одну пробирку названием образца и символом «плюс». Сняли крышку и поместили пробирку в левую камеру. Промаркировали вторую пробирку названием образца и символом «минус». Сняли крышку и поместили пробирку в правую камеру.

[002185] Щелкнули на иконку «Load Collection», показанную на диаграмме выше. Выбирали 4 для давления образца. Щелкнули по иконке «Run». Дожидались появления клеток на экране. Около 15 секунд. Регулировали давление образца так, чтобы общее количество событий в секунду было ниже 5000. Щелкнули на иконку начала сортировки. Регулировали давление образца так, чтобы эффективность сортировки составляла по меньшей мере 85%. Регистрировали 50000 событий CD3. См. диаграмму ниже. Запись останавливается автоматически. В появившемся диалоговом окне нажали кнопку ОК.

[002186] Если в любой фракции собрано более $4,5\times10^6$ клеток, пробирку(и) для сбора

необходимо заменить. Щелкнули по иконке остановки сортировки. Щелкнули по иконке паузы. Открыли дверцу камеры для сбора и заменил исходные пробирки для сбора на новые пробирки для сбора; закрыли дверцу и положили оригинальные пробирки на лед. Щелкнули по иконке «Next Tube». Щелкнули по иконке «Load Collection». Щелкнули по иконке воспроизведения. Щелкнули по иконке «Start Sort».

[002187] Продолжали сортировку, пока в пробирке не закончится образец. Не считали критичным, если пробирка была «сухой». Вынимали пробирку с образцом из камеры для образцов. Отбрасывали. Удаляли отсортированные фракцию из камеры для сбора. Закрывали пробирки и несколько раз осторожно переворачивали, чтобы капли, находящиеся в верхней части пробирки, попали в раствор. Осторожно постукивали пробирками по поверхности BSC, чтобы удалить излишки раствора с верхней части пробирки и крышки. Клали пробирки на лед. Проверяли проценты селективности фракций PD-1. Помещали коническую пробирку на 14 мл с EtOH в камеру для образцов. Щелкнули по иконке «Probe Wash». Повторяли. Вынули пробирку с EtOH и добавили пробирку с положительной фракцией. Изменили значение давления образца на 7. Щелкнули по иконке «Next Tube». Назвали пробирку именем образца и «pos select». Нажали кнопку воспроизведения и зарегистрировали 75 CD3-положительных событий. Сразу останавливали пробирку и вынимали ее из камеры для образцов. Повторяли эти шаги для отрицательного отбора образца.

[002188] Экспортировали данные. Выбирали пробирку PD-1 FMO двойным щелчком по ней. Выбирали Файл/Печать. Печатали в формате PDF вместо принтера. Таким образом был получен полный 6-страничный отчет по образцу. Повторяли для каждой из собранных пробирок. Выключили прибор.

Протокол быстрой экспансии PD-1^{High}

День 0 - REP1

[002189] Приготовление среды: готовили или подогревали 1 л CM-1+6000 МЕ/мл IL-2.

[002190] Подготовка фидерных клеток МНПК: размораживали подходящее количество флаконов для REP-1 (100e6 МНПК требовалось для полного масштаба, и 10e6 требовалось для контроля CD3+ общей массы, исходили из количества 60e6-80e6 МНПК на 1 мл флакон). Помещали 40 мл теплой CM1+IL-2 в коническую пробирку на 50 мл и пипеткой переносили фидеры МНПК из флаконов на 1 мл в коническую пробирку. Переливали пипеткой размороженные фидеры МНПК, чтобы тщательно перемешать, и проводили 2 подсчета клеток на NC-200.

[002191] Рассчитывали соответствующий объем для переноса в G-Rex 100M и G-Rex 10M, чтобы перенести 100e6 и 10e6 МНПК, соответственно.

[002192] Добавляли 30 мкл антитела к CD3 (OKT-3) в G-Rex 100M и 3 мкл в G-rex 10M. Помещали колбы в инкубатор.

Высевание TIL для REP-1

[002193] Поместили все отсортированные PD-1^{High} в G-Rex 100M. Для контрольного

условия CD3+ общей массы TIL добавляли эквивалентное количество CD3+ клеток к PD-1^{High} клеткам в полном масштабе в соотношении 1/10. Чтобы получить необходимый объем гидролизата, осуществляли следующие действия: 1) Рассчитывали CD3+ TVC/мл в гидролизате путем умножения полученных на этапе 9.3.5 TVC гидролизата на % CD3+ живых клеток, полученный из результата сортировки. (т. е. 10e6*10%=1e6), 2) После получения этого числа делили количество PD-1^{High} клеток, высеянных в полномасштабных условиях, на это число. (т. е. 1e5/1e6=0,1 мл), и 3) Добавляли этот объем (0,1 мл) гидролизата в колбу с основной массой CD3+ TIL и заполняли до 100 мл с помощью CM1+IL-2. Помещали все колбы в инкубатор при 37 ^{0}C, 5% CO_2.

День 11, День 16, День 22

[002194] Последовал полномасштабный процесс. Условие общей массы CD3+ TIL обрабатывали аналогично этапам, описанным в примере 9.

Критерии приемлемости

[002195] В таблице 81 ниже указаны критерии приемлемости, которые будут использованы для оценки показателей трех полномасштабных партий.

Таблица 81. Тестирование и критерии приемлемости собранного продукта

Тип теста	**Метод**	**Критерий приемлемости**
Тестирование в ходе процесса		
Чистота после сортировки (%PD1+)	Проточная цитометрия	$\geq$ 80%
Тестирование при выпуске		
Внешний вид	Визуальный осмотр	Пакет не поврежден, комочков нет
Жизнеспособность клеток	Флуоресценция	$\geq$ 70%
Общее количество жизнеспособных клеток	Флуоресценция	от 1×10^9 до 150×10^9
Принадлежность (%CD45+CD3+)	Проточная цитометрия	$\geq$ 90% CD45+CD3+ клеток
IFNg (стимулированные - нестимулированные)	Стимуляция гранулами и ELISA	$\geq$ 500 пг/мл

[002196] В таблице 82 ниже указаны дополнительные проведенные исследования характеристик готового продукта, проведенные только в информационных целях.

Таблица 82. Определение характеристик готового продукта (только в информационных целях)

Тип теста	**Метод**	**Отчет о результатах**
Чистота и фенотип	Проточная цитометрия	Отчет о результатах

субпопуляции Т-клеток памяти	(LAB-055)	
Маркер фенотипа активации и истощения	Проточная цитометрия (LAB-061)	Отчет о результатах
Длина теломер	Flow FISH (Приложение-1)	Отчет о результатах
Гранзим В	Стимуляция гранулами и ELISA (LAB-064)	Отчет о результатах
CD107A	Митогенная стимуляция и проточная цитометрия (LAB-061)	Отчет о результатах
Секвенирование TCR Vбета	Глубокое секвенирование (Irepertoire, Inc)	Отчет о результатах (если есть)
Анализ метаболитов	Биохимический анализатор Cedex	Отчет о результатах

ЦИТИРУЕМЫЕ ДОКУМЕНТЫ ДЛЯ ПРИМЕРА 21

Rosenberg, S.A., et al., Durable complete responses in heavily pretreated patients with metastatic melanoma using T-cell transfer immunotherapy. Clin Cancer Res, 2011. **17**(13): p. 4550-7

Kvistborg, P., et al., TIL therapy broadens the tumor-reactive CD8(+) T cell compartment in melanoma patients. Oncoimmunology, 2012. **1**(4): p. 409-418

Simoni, Y., et al., Bystander CD8(+) T cells are abundant and phenotypically distinct in human tumour infiltrates. Nature, 2018. **557**(7706): p. 575-579

Schumacher, T.N. and R.D. Schreiber, Neoantigens in cancer immunotherapy. Science, 2015. **348**(6230): p. 69-74

Turcotte, S., et al., Phenotype and function of T cells infiltrating visceral metastases from gastrointestinal cancers and melanoma: implications for adoptive cell transfer therapy. J Immunol, 2013. **191**(5): p. 2217-25

Inozume, T., et al., Selection of CD8+PD-1+ lymphocytes in fresh human melanomas enriches for tumor-reactive T cells. J Immunother, 2010. **33**(9): p. 956-64.

Gros, A., et al., PD-1 identifies the patient-specific CD8(+) tumor-reactive repertoire infiltrating human tumors. J Clin Invest, 2014. **124**(5): p. 2246-59.

Thommen, D.S., et al., A transcriptionally and functionally distinct PD-1(+) CD8(+) T cell pool with predictive potential in non-small-cell lung cancer treated with PD-1 blockade. Nat Med, 2018.

[002197] Приведенные выше примеры представлены для того, чтобы предоставить

рядовым специалистам в данной области техники полное раскрытие и описание того, как создавать и применять варианты осуществления композиций, систем и способов согласно данному изобретению, и не предназначены для ограничения объема того, что авторы изобретения считают своим изобретением. 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.

[002198] 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.

[002199] 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.

[002200] 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 осуществления данного изобретения и примеры, описанные в данном документе, предлагаются только в качестве примера, и данная заявка должна ограничиваться только условиями прилагаемой формулы изобретения вместе с полным объемом эквивалентов, на которые распространяется формула данного изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ экспансии опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов (TIL) в терапевтическую популяцию TIL, включающий:

(a) получение и/или прием первой популяции TIL из опухоли, резецированной у субъекта, путем обработки образца опухоли, полученного от указанного субъекта, с получением множества фрагментов опухоли;

(b) отбор положительных по PD-1 TIL из первой популяции TIL из этапа (a) с получением обогащенной по PD-1 популяции TIL;

(c) проведение примирующей первой экспансии путем культивирования указанной обогащенной по PD-1 популяции TIL в среде для культивирования клеток, содержащей IL-2, OKT-3 и антигенпрезентирующие клетки (АПК), с получением второй популяции TIL, где примирующую первую экспансию проводят в контейнере, содержащем первую газопроницаемую площадь поверхности, где примирующую первую экспансию проводят в течение первого периода приблизительно от 1 до 7/8 дней с получением указанной второй популяции TIL, где указанная вторая популяция TIL больше по численности, чем указанная первая популяция TIL;

(d) проведение быстрой второй экспансии путем добавления в среду для культивирования клеток указанной второй популяции TIL добавок IL-2, OKT-3 и АПК с получением третьей популяции TIL, где количество АПК, добавляемое при быстрой второй экспансии, по меньшей мере в два раза больше, чем количество АПК, добавляемое на этапе (b), где быструю вторую экспансию проводят в течение второго периода приблизительно от 1 до 11 дней с получением указанной третьей популяции TIL, где указанная третья популяция TIL представляет собой терапевтическую популяцию TIL, где быструю вторую экспансию проводят в контейнере, содержащем вторую газопроницаемую площадь поверхности;

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

(f) перенос собранной популяции TIL из этапа (e) в пакет для инфузии.

2. Способ экспансии опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов (TIL) в терапевтическую популяцию TIL, включающий:

получение и/или прием первой популяции TIL из опухоли, резецированной у субъекта, путем обработки образца опухоли, полученного от указанного субъекта, с получением множества фрагментов опухоли;

отбор положительных по PD-1 TIL из первой популяции TIL из этапа (a) с получением обогащенной по PD-1 популяции TIL;

проведение примирующей первой экспансии путем культивирования указанной обогащенной по PD-1 популяции TIL в среде для культивирования клеток, содержащей IL-2, OKT-3, и необязательно содержащей антигенпрезентирующие клетки (АПК), с получением второй популяции TIL, где примирующую первую экспансию проводят в течение первого периода приблизительно от 1 до 7/8 дней с получением указанной второй популяции TIL, где указанная вторая популяция TIL больше по численности, чем указанная

первая популяция TIL;

проведение быстрой второй экспансии путем приведения указанной второй популяции TIL в контакт со средой для культивирования клеток, содержащей IL-2, OKT-3 и АПК, с получением третьей популяции TIL, где быструю вторую экспансию проводят в течение второго периода приблизительно от 1 до 11 дней с получением указанной третьей популяции TIL, где указанная третья популяция TIL представляет собой терапевтическую популяцию TIL; и

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

3. Способ по п. 2, отличающийся тем, что на этапе (b) среда для культивирования клеток дополнительно содержит антигенпрезентирующие клетки (АПК), где количество АПК в культуральной среде на этапе (c) больше, чем количество АПК в культуральной среде на этапе (b).

4. Способ по п. 2, отличающийся тем, что на этапе (b) среда для культивирования клеток дополнительно содержит антигенпрезентирующие клетки (АПК), и где количество АПК в культуральной среде на этапе (c) равно количеству АПК в культуральной среде на этапе (b).

5. Способ по п. 1 или п. 2, отличающийся тем, что указанные положительные по PD-1 TIL представляют собой PD-1high TIL.

6. Способ экспансии опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов (TIL) в терапевтическую популяцию TIL, включающий:

(a) проведение примирующей первой экспансии путем культивирования первой популяции TIL, которые были отобраны как положительные по PD-1, где указанная первая популяция TIL может быть получена путем обработки образца опухоли от субъекта путем гидролиза опухоли и отбора положительных по PD-1 TIL, в среде для культивирования клеток, содержащей IL-2, OKT-3 и антигенпрезентирующие клетки (АПК), с получением второй популяции TIL, где примирующую первую экспансию проводят в контейнере, содержащем первую газопроницаемую площадь поверхности, где примирующую первую экспансию проводят в течение первого периода приблизительно от 1 до 7/8 дней с получением указанной второй популяции TIL, где указанная вторая популяция TIL больше по численности, чем указанная первая популяция TIL;

(b) проведение быстрой второй экспансии путем приведения указанной второй популяции TIL в контакт со средой для культивирования клеток указанной второй популяции TIL с добавками IL-2, OKT-3 и АПК с получением третьей популяции TIL, где количество АПК при быстрой второй экспансии по меньшей мере в два раза больше, чем количество АПК на этапе (a), где быструю вторую экспансию проводят в течение второго периода приблизительно от 1 до 11 дней с получением указанной третьей популяции TIL, где указанная третья популяция TIL представляет собой терапевтическую популяцию TIL, где быструю вторую экспансию проводят в контейнере, содержащем вторую газопроницаемую площадь поверхности; и

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

7. Способ экспансии опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов (TIL) в терапевтическую популяцию TIL, включающий:

(a) проведение примирующей первой экспансии TIL, которые были отобраны как положительные по PD-1, путем культивирования первой популяции TIL в среде для культивирования клеток, содержащей IL-2, OKT-3, и необязательно содержащей антигенпрезентирующие клетки (АПК), с получением второй популяции TIL, где примирующую первую экспансию проводят в течение первого периода приблизительно от 1 до 7/8 дней с получением указанной второй популяции TIL, где указанная вторая популяция TIL больше по численности, чем указанная первая популяция TIL;

(b) проведение быстрой второй экспансии путем приведения указанной второй популяции TIL в контакт со средой для культивирования клеток, содержащей IL-2, OKT-3 и АПК, с получением третьей популяции TIL, где быструю вторую экспансию проводят в течение второго периода приблизительно от 1 до 11 дней с получением указанной третьей популяции TIL, где указанная третья популяция TIL представляет собой терапевтическую популяцию TIL; и

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

8. Способ по п. 6, отличающийся тем, что на этапе (b) среда для культивирования клеток дополнительно содержит антигенпрезентирующие клетки (АПК), и где количество АПК в культуральной среде на этапе (c) больше, чем количество АПК в культуральной среде на этапе (b).

9. Способ по п. 6, отличающийся тем, что на этапе (b) среда для культивирования клеток дополнительно содержит антигенпрезентирующие клетки (АПК), и где количество АПК в культуральной среде на этапе (c) равно количеству АПК в культуральной среде на этапе (b).

10. Способ по п. 6 или п. 7, отличающийся тем, что указанные положительные по PD-1 TIL представляют собой PD-1high TIL.

11. Способ по пп. 1 или 2, или 6, или 7, отличающийся тем, что отбор на этапе (b) включает этапы (i) воздействия на первую популяцию TIL избытка моноклонального антитела IgG4 к PD-1, которое связывается с PD-1 через N-концевую петлю за пределами домена IgV PD-1, (ii) добавления избытка антитела к IgG4, конъюгированного с флуорофором, и (iii) проведения проточной сортировки клеток на основе флуорофора с получением обогащенной по PD-1 популяции TIL.

12. Способ по п. 11, отличающийся тем, что моноклональное антитело IgG4 к PD-1 представляет собой ниволумаб или его варианты, фрагменты или конъюгаты.

13. Способ по п. 12, отличающийся тем, что антитело к IgG4 представляет собой клон к IgG4 человека, клон HP6023.

14. Способ по пп. 1 или 2, или 6, или 7, отличающийся тем, что соотношение количества АПК при быстрой второй экспансии и количества АПК при примирующей первой экспансии выбрано из диапазона от приблизительно 1,5:1 до приблизительно 20:1.

15. Способ по пп. 1 или 2, или 6, или 7, отличающийся тем, что соотношение выбрано

из диапазона от приблизительно 1,5:1 до приблизительно 10:1.

16. Способ по пп. 1 или 2, или 6, или 7, отличающийся тем, что соотношение выбрано из диапазона от приблизительно 2:1 до приблизительно 5:1.

17. Способ по пп. 1 или 2, или 6, или 7, отличающийся тем, что соотношение выбрано из диапазона от приблизительно 2:1 до приблизительно 3:1.

18. Способ по пп. 1 или 2, или 6, или 7, отличающийся тем, что соотношение составляет приблизительно 2:1.

19. Способ по пп. 1 или 2, или 6, или 7, отличающийся тем, что количество АПК при примирующей первой экспансии выбрано из диапазона от приблизительно 1×10^8 АПК до приблизительно $3,5\times10^8$ АПК, и где количество АПК при быстрой второй экспансии выбрано из диапазона от приблизительно $3,5\times10^8$ АПК до приблизительно 1×10^9 АПК.

20. Способ по пп. 1 или 2, или 6, или 7, отличающийся тем, что количество АПК при примирующей первой экспансии выбрано из диапазона от приблизительно $1,5\times10^8$ АПК до приблизительно 3×10^8 АПК, и где количество АПК при быстрой второй экспансии выбрано из диапазона от приблизительно 4×10^8 АПК до приблизительно $7,5\times10^8$ АПК.

21. Способ по пп. 1 или 2, или 6, или 7, отличающийся тем, что количество АПК при примирующей первой экспансии выбрано из диапазона от приблизительно 2×10^8 АПК до приблизительно $2,5\times10^8$ АПК, и где количество АПК при быстрой второй экспансии выбрано из диапазона от приблизительно $4,5\times10^8$ АПК до приблизительно $5,5\times10^8$ АПК.

22. Способ по пп. 1 или 2, или 6, или 7, отличающийся тем, что приблизительно $2,5\times10^8$ АПК добавляют при примирующей первой экспансии и 5×10^8 АПК добавляют при быстрой второй экспансии.

23. Способ по любому из пп. 1-22, отличающийся тем, что соотношение количества TIL в указанной второй популяции TIL и количества TIL в указанной первой популяции TIL составляет от приблизительно 1,5:1 до приблизительно 100:1.

24. Способ по любому из пп. 1-22, отличающийся тем, что соотношение количества TIL в указанной второй популяции TIL и количества TIL в указанной первой популяции TIL составляет приблизительно 50:1.

25. Способ по любому из пп. 1-22, отличающийся тем, что соотношение количества TIL в указанной второй популяции TIL и количества TIL в указанной первой популяции TIL составляет приблизительно 25:1.

26. Способ по любому из пп. 1-22, отличающийся тем, что соотношение количества TIL в указанной второй популяции TIL и количества TIL в указанной первой популяции TIL составляет приблизительно 20:1.

27. Способ по любому из пп. 1-22, отличающийся тем, что соотношение количества TIL в указанной второй популяции TIL и количества TIL в указанной первой популяции TIL составляет приблизительно 10:1.

28. Способ по любому из пп. 1-22, отличающийся тем, что указанная вторая популяция TIL по меньшей мере в 50 раз больше по численности, чем указанная первая популяция TIL.

29. Способ по любому из пп. 2-28, отличающийся тем, что способ включает проведение после этапа сбора терапевтической популяции TIL дополнительного этапа переноса собранной терапевтической популяции TIL в пакет для инфузии.

30. Способ по любому из пп. 1-28, отличающийся тем, что множество фрагментов опухоли распределяют во множество отдельных контейнеров, в каждом из которых получают вторую популяцию TIL из первой популяции TIL на этапе примирующей первой экспансии, и получают третью популяцию TIL из второй популяции TIL на этапе быстрой второй экспансии, и при этом терапевтическую популяцию TIL, полученную из третьей популяции TIL, собирают из каждого из множества контейнеров и объединяют с получением собранной популяции TIL.

31. Способ по п. 30, отличающийся тем, что множество отдельных контейнеров включает по меньшей мере два отдельных контейнера.

32. Способ по п. 30, отличающийся тем, что множество отдельных контейнеров включает от двух до двадцати отдельных контейнеров.

33. Способ по п. 30, отличающийся тем, что множество отдельных контейнеров включает от двух до десяти отдельных контейнеров.

34. Способ по п. 30, отличающийся тем, что множество отдельных контейнеров включает от двух до пяти отдельных контейнеров.

35. Способ по любому из пп. 30-34, отличающийся тем, что каждый из отдельных контейнеров содержит первую газопроницаемую площадь поверхности.

36. Способ по любому из пп. 1-29, отличающийся тем, что множество фрагментов опухоли распределяют в одном контейнере.

37. Способ по п. 36, отличающийся тем, что один контейнер содержит первую газопроницаемую площадь поверхности.

38. Способ по п. 33 или п. 37, отличающийся тем, что на этапе примирующей первой экспансии среда для культивирования клеток содержит антигенпрезентирующие клетки (АПК), и АПК наслаивают на первую газопроницаемую площадь поверхности со средней толщиной от приблизительно одного клеточного слоя до приблизительно трех клеточных слоев.

39. Способ по п. 36, отличающийся тем, что на этапе примирующей первой экспансии АПК наслаивают на первую газопроницаемую площадь поверхности со средней толщиной от приблизительно 1,5 клеточных слоев до приблизительно 2,5 клеточных слоев.

40. Способ по п. 38, отличающийся тем, что на этапе примирующей первой экспансии АПК наслаивают на первую газопроницаемую площадь поверхности со средней толщиной приблизительно 2 клеточных слоя.

41. Способ по любому из пп. 38-40, отличающийся тем, что на этапе быстрой второй экспансии АПК наслаивают на первую газопроницаемую площадь поверхности с толщиной от приблизительно 3 клеточных слоев до приблизительно 5 клеточных слоев.

42. Способ по п. 41, отличающийся тем, что на этапе быстрой второй экспансии АПК наслаивают на первую газопроницаемую площадь поверхности с толщиной от

приблизительно 3,5 клеточных слоев до приблизительно 4,5 клеточных слоев.

43. Способ по п. 42, отличающийся тем, что на этапе быстрой второй экспансии АПК наслаивают на первую газопроницаемую площадь поверхности с толщиной приблизительно 4 клеточных слоя.

44. Способ по любому из пп. 2-29, отличающийся тем, что на этапе примирующей первой экспансии примирующую первую экспансию проводят в первом контейнере, содержащем первую газопроницаемую площадь поверхности, а на этапе быстрой второй экспансии быструю вторую экспансию проводят во втором контейнере, содержащем вторую газопроницаемую площадь поверхности.

45. Способ по п. 44, отличающийся тем, что указанный второй контейнер больше, чем указанный первый контейнер.

46. Способ по п. 42 или п. 43, отличающийся тем, что на этапе примирующей первой экспансии среда для культивирования клеток содержит антигенпрезентирующие клетки (АПК), и АПК наслаивают на первую газопроницаемую площадь поверхности со средней толщиной от приблизительно одного клеточного слоя до приблизительно трех клеточных слоев.

47. Способ по п. 46, отличающийся тем, что на этапе примирующей первой экспансии АПК наслаивают на первую газопроницаемую площадь поверхности со средней толщиной от приблизительно 1,5 клеточных слоев до приблизительно 2,5 клеточных слоев.

48. Способ по п. 48, отличающийся тем, что на этапе примирующей первой экспансии АПК наслаивают на первую газопроницаемую площадь поверхности со средней толщиной приблизительно 2 клеточных слоя.

49. Способ по любому из пп. 44-48, отличающийся тем, что на этапе быстрой второй экспансии АПК наслаивают на вторую газопроницаемую площадь поверхности со средней толщиной от приблизительно 3 клеточных слоев до приблизительно 5 клеточных слоев.

50. Способ по п. 49, отличающийся тем, что на этапе быстрой второй экспансии АПК наслаивают на вторую газопроницаемую площадь поверхности со средней толщиной от приблизительно 3,5 клеточных слоев до приблизительно 4,5 клеточных слоев.

51. Способ по п. 49, отличающийся тем, что на этапе быстрой второй экспансии АПК наслаивают на вторую газопроницаемую площадь поверхности со средней толщиной приблизительно 4 клеточных слоя.

52. Способ по любому из пп. 2-43, отличающийся тем, что для каждого контейнера, в котором проводят примирующую первую экспансию с первой популяцией TIL, быструю вторую экспансию проводят в том же контейнере со второй популяцией TIL, полученной из такой первой популяции TIL.

53. Способ по п. 52, отличающийся тем, что каждый контейнер содержит первую газопроницаемую площадь поверхности.

54. Способ по п. 53, отличающийся тем, что на этапе примирующей первой экспансии среда для культивирования клеток содержит антигенпрезентирующие клетки (АПК), и АПК наслаивают на первую газопроницаемую площадь поверхности со средней

толщиной от приблизительно одного клеточного слоя до приблизительно трех клеточных слоев.

55. Способ по п. 54, отличающийся тем, что на этапе примирующей первой экспансии АПК наслаивают на первую газопроницаемую площадь поверхности со средней толщиной от приблизительно 1,5 клеточных слоев до приблизительно 2,5 клеточных слоев.

56. Способ по п. 55, отличающийся тем, что на этапе примирующей первой экспансии АПК наслаивают на первую газопроницаемую площадь поверхности со средней толщиной приблизительно 2 клеточных слоя.

57. Способ по любому из пп. 53-56, отличающийся тем, что на этапе быстрой второй экспансии АПК наслаивают на первую газопроницаемую площадь поверхности со средней толщиной от приблизительно 3 клеточных слоев до приблизительно 5 клеточных слоев.

58. Способ по п. 57, отличающийся тем, что на этапе быстрой второй экспансии АПК наслаивают на первую газопроницаемую площадь поверхности со средней толщиной от приблизительно 3,5 клеточных слоев до приблизительно 4,5 клеточных слоев.

59. Способ по п. 58, отличающийся тем, что на этапе быстрой второй экспансии АПК наслаивают на первую газопроницаемую площадь поверхности со средней толщиной приблизительно 4 клеточных слоя.

60. Способ по любому из пп. 2-36, 44, 46 и 52, отличающийся тем, что для каждого контейнера, в котором проводят примирующую первую экспансию с первой популяцией TIL на этапе примирующей первой экспансии, первый контейнер содержит первую площадь поверхности, среда для культивирования клеток содержит антигенпрезентирующие клетки (АПК), и АПК наслаивают на первую газопроницаемую площадь поверхности, и при этом соотношение среднего количества слоев АПК, наслоенных на этапе примирующей первой экспансии, и среднего количества слоев АПК, наслоенных на этапе быстрой второй экспансии, выбрано из диапазона от приблизительно 1:1,1 до приблизительно 1:10.

61. Способ по п. 60, отличающийся тем, что соотношение среднего количества слоев АПК, наслоенных на этапе примирующей первой экспансии, и среднего количества слоев АПК, наслоенных на этапе быстрой второй экспансии, выбрано из диапазона от приблизительно 1:1,2 до приблизительно 1:8.

62. Способ по п. 60, отличающийся тем, что соотношение среднего количества слоев АПК, наслоенных на этапе примирующей первой экспансии, и среднего количества слоев АПК, наслоенных на этапе быстрой второй экспансии, выбрано из диапазона от приблизительно 1:1,3 до приблизительно 1:7.

63. Способ по п. 60, отличающийся тем, что соотношение среднего количества слоев АПК, наслоенных на этапе примирующей первой экспансии, и среднего количества слоев АПК, наслоенных на этапе быстрой второй экспансии, выбрано из диапазона от приблизительно 1:1,4 до приблизительно 1:6.

64. Способ по п. 60, отличающийся тем, что соотношение среднего количества слоев АПК, наслоенных на этапе примирующей первой экспансии, и среднего количества слоев

АПК, наслоенных на этапе быстрой второй экспансии, выбрано из диапазона от приблизительно 1:1,5 до приблизительно 1:5.

65. Способ по п. 60, отличающийся тем, что соотношение среднего количества слоев АПК, наслоенных на этапе примирующей первой экспансии, и среднего количества слоев АПК, наслоенных на этапе быстрой второй экспансии, выбрано из диапазона от приблизительно 1:1,6 до приблизительно 1:4.

66. Способ по п. 60, отличающийся тем, что соотношение среднего количества слоев АПК, наслоенных на этапе примирующей первой экспансии, и среднего количества слоев АПК, наслоенных на этапе быстрой второй экспансии, выбрано из диапазона от приблизительно 1:1,7 до приблизительно 1:3,5.

67. Способ по п. 60, отличающийся тем, что соотношение среднего количества слоев АПК, наслоенных на этапе примирующей первой экспансии, и среднего количества слоев АПК, наслоенных на этапе быстрой второй экспансии, выбрано из диапазона от приблизительно 1:1,8 до приблизительно 1:3.

68. Способ по п. 60, отличающийся тем, что соотношение среднего количества слоев АПК, наслоенных на этапе примирующей первой экспансии, и среднего количества слоев АПК, наслоенных на этапе быстрой второй экспансии, выбрано из диапазона от приблизительно 1:1,9 до приблизительно 1:2,5.

69. Способ по п. 60, отличающийся тем, что соотношение среднего количества слоев АПК, наслоенных на этапе примирующей первой экспансии, и среднего количества слоев АПК, наслоенных на этапе быстрой второй экспансии, составляет приблизительно 1:2.

70. Способ по любому из пп. 1-69, отличающийся тем, что через 2-3 дня на этапе быстрой второй экспансии в среду для культивирования клеток добавляют добавку IL-2.

71. Способ по любому из пп. 1-70, дополнительно включающий криоконсервацию собранной популяции TIL на этапе сбора терапевтической популяции TIL с использованием процесса криоконсервации.

72. Способ по п. 1 или п. 29, дополнительно включающий этап криоконсервации пакета для инфузии.

73. Способ по п. 71 или п. 72, отличающийся тем, что процесс криоконсервации проводят с использованием соотношения собранной популяции TIL и среды для криоконсервации, составляющего 1:1.

74. Способ по любому из пп. 1-73, отличающийся тем, что антигенпрезентирующие клетки представляют собой мононуклеарные клетки периферической крови (МНПК).

75. Способ по п. 74, отличающийся тем, что МНПК являются облученными и аллогенными.

76. Способ по любому из пп. 1-75, отличающийся тем, что на этапе примирующей первой экспансии среда для культивирования клеток содержит мононуклеарные клетки периферической крови (МНПК), и при этом общее количество МНПК в среде для культивирования клеток на этапе примирующей первой экспансии составляет $2,5 \times 10^8$.

77. Способ по любому из пп. 1-76, отличающийся тем, что на этапе быстрой второй

экспансии антигенпрезентирующие клетки (АПК) в среде для культивирования клеток представляют собой мононуклеарные клетки периферической крови (МНПК), и при этом общее количество МНПК, добавленных в среду для культивирования клеток на этапе быстрой второй экспансии, составляет 5×10^8.

78. Способ по любому из пп. 1-70, отличающийся тем, что антигенпрезентирующие клетки представляют собой искусственные антигенпрезентирующие клетки.

79. Способ по любому из пп. 1-78, отличающийся тем, что сбор на этапе сбора терапевтической популяции TIL проводят с использованием мембранной системы обработки клеток.

80. Способ по любому из пп. 1-79, отличающийся тем, что сбор на этапе (d) проводят с использованием системы обработки клеток LOVO.

81. Способ по любому из пп. 1-80, отличающийся тем, что множество фрагментов включает приблизительно 60 фрагментов на контейнер на этапе примирующей первой экспансии, где каждый фрагмент имеет объем приблизительно 27 $мм^3$.

82. Способ по любому из пп. 1-81, отличающийся тем, что множество фрагментов включает от приблизительно 30 до приблизительно 60 фрагментов с общим объемом от приблизительно 1300 $мм^3$ до приблизительно 1500 $мм^3$.

83. Способ по п. 82, отличающийся тем, что множество фрагментов включает приблизительно 50 фрагментов с общим объемом приблизительно 1350 $мм^3$.

84. Способ по любому из пп. 1-83, отличающийся тем, что множество фрагментов включает приблизительно 50 фрагментов с общей массой от приблизительно 1 грамма до приблизительно 1,5 граммов.

85. Способ по любому из пп. 1-84, отличающийся тем, что среда для культивирования клеток предоставлена в контейнере, выбранном из группы, состоящей из G-контейнера и Xuri cellbag.

86. Способ по любому из пп. 1-85, отличающийся тем, что через 2-3 дня на этапе (d) в среду для культивирования клеток добавляют добавку IL-2.

87. Способ по любому из пп. 1-86, отличающийся тем, что концентрация IL-2 составляет от приблизительно 10000 МЕ/мл до приблизительно 5000 МЕ/мл.

88. Способ по любому из пп. 1-87, отличающийся тем, что концентрация IL-2 составляет приблизительно 6000 МЕ/мл.

89. Способ по п. 1 или п. 29, отличающийся тем, что пакет для инфузии на этапе переноса собранной терапевтической популяции TIL в пакет для инфузии представляет собой пакет для инфузии, содержащий HypoThermosol.

90. Способ по любому из пп. 71-73, отличающийся тем, что среда для криоконсервации содержит диметилсульфоксид (ДМСО).

91. Способ по п. 90, отличающийся тем, что среда для криоконсервации содержит от 7% до 10% ДМСО.

92. Способ по любому из пп. 1-91, отличающийся тем, что первый период на этапе примирующей первой экспансии и второй период на этапе быстрой второй экспансии

каждый в отдельности проводят в течение периода 5 дней, 6 дней, 7 дней, 8 дней, 9 дней, 10 дней или 11 дней.

93. Способ по любому из пп. 1-92, отличающийся тем, что первый период на этапе примирующей первой экспансии проводят в течение периода 5 дней, 6 дней или 7 дней.

94. Способ по любому из пп. 1-92, отличающийся тем, что второй период на этапе быстрой второй экспансии проводят в течение периода 7 дней, 8 дней или 9 дней.

95. Способ по любому из пп. 1-92, отличающийся тем, что первый период на этапе примирующей первой экспансии и второй период на этапе быстрой второй экспансии каждый в отдельности проводят в течение периода 7 дней.

96. Способ по любому из пп. 1-92, отличающийся тем, что этапы от примирующей первой экспансии до сбора терапевтической популяции TIL проводят в течение периода от приблизительно 14 дней до приблизительно 16 дней.

97. Способ по любому из пп. 1-92, отличающийся тем, что этапы от примирующей первой экспансии до сбора терапевтической популяции TIL проводят в течение периода от приблизительно 15 дней до приблизительно 16 дней.

98. Способ по любому из пп. 1-92, отличающийся тем, что этапы от примирующей первой экспансии до сбора терапевтической популяции TIL проводят в течение периода приблизительно 14 дней.

99. Способ по любому из пп. 1-92, отличающийся тем, что этапы от примирующей первой экспансии до сбора терапевтической популяции TIL проводят в течение периода приблизительно 15 дней.

100. Способ по любому из пп. 1-92, отличающийся тем, что этапы от примирующей первой экспансии до сбора терапевтической популяции TIL проводят в течение периода приблизительно 16 дней.

101. Способ по любому из пп. 1-92, дополнительно включающий этап криоконсервации собранной терапевтической популяции TIL с использованием процесса криоконсервации, где этапы от примирующей первой экспансии до сбора терапевтической популяции TIL и криоконсервации проводят за 16 дней или менее.

102. Способ по любому из пп. 1-101, отличающийся тем, что терапевтическая популяция TIL, собранная на этапе сбора терапевтической популяции TIL, содержит достаточное количество TIL для терапевтически эффективной дозировки TIL.

103. Способ по п. 102, отличающийся тем, что количество TIL, достаточное для терапевтически эффективной дозировки, составляет от приблизительно $2{,}3\times10^{10}$ до приблизительно $13{,}7\times10^{10}$.

104. Способ по любому из пп. 1-103, отличающийся тем, что третья популяция TIL на этапе быстрой второй экспансии обеспечивает повышенную эффективность, повышенную продукцию интерферона-гамма и/или повышенную поликлональность.

105. Способ по любому из пп. 1-103, отличающийся тем, что третья популяция TIL на этапе быстрой второй экспансии обеспечивает по меньшей мере в 1-5 или более раз более высокую продукцию интерферона-гамма по сравнению с TIL, полученными с помощью

процесса, длящегося более 16 дней.

106. Способ по любому из пп. 1-103, отличающийся тем, что эффекторные Т-клетки и/или Т-клетки центральной памяти, полученные из третьей популяции TIL на этапе быстрой второй экспансии, демонстрируют повышенную экспрессию CD8 и CD28 по сравнению с эффекторными Т-клетками и/или Т-клетками центральной памяти, полученными из второй популяции TIL на этапе примирующей первой экспансии.

107. Способ по любому из пп. 1-106, отличающийся тем, что терапевтическую популяцию TIL из этапа сбора терапевтической популяции TIL вводят пациенту путем инфузии.

108. Способ по пп. 1 или 2, или 5, или 6, дополнительно включающий этап криоконсервации пакета для инфузии, содержащего собранную популяцию TIL, из этапа (f) с использованием процесса криоконсервации.

109. Способ по пп. 1 или 2, или 5, или 6, отличающийся тем, что процесс криоконсервации проводят с использованием соотношения собранной популяции TIL и среды для криоконсервации, составляющего 1:1.

110. Способ по пп. 1 или 2, или 5, или 6, отличающийся тем, что антигенпрезентирующие клетки представляют собой мононуклеарные клетки периферической крови (МНПК).

111. Способ по п. 110, отличающийся тем, что МНПК являются облученными и аллогенными.

112. Способ по пп. 1 или 2, или 6, или 7, отличающийся тем, что антигенпрезентирующие клетки представляют собой искусственные антигенпрезентирующие клетки.

113. Способ по пп. 1 или 2, или 6, или 7, отличающийся тем, что сбор на этапе (e) проводят с использованием мембранной системы обработки клеток.

114. Способ по пп. 1 или 2, или 6, или 7, отличающийся тем, что сбор на этапе (e) проводят с использованием системы обработки клеток LOVO.

115. Способ по пп. 1 или 2, или 6, или 7, отличающийся тем, что множество фрагментов включает приблизительно 60 фрагментов на первую газопроницаемую площадь поверхности на этапе (c), где каждый фрагмент имеет объем приблизительно 27 $мм^3$.

116. Способ по пп. 1 или 2, или 6, или 7, отличающийся тем, что множество фрагментов включает от приблизительно 30 до приблизительно 60 фрагментов с общим объемом от приблизительно 1300 $мм^3$ до приблизительно 1500 $мм^3$.

117. Способ по п. 116, отличающийся тем, что множество фрагментов включает приблизительно 50 фрагментов с общим объемом приблизительно 1350 $мм^3$.

118. Способ по пп. 1 или 2, или 6, или 7, отличающийся тем, что множество фрагментов включает приблизительно 50 фрагментов с общей массой от приблизительно 1 грамма до приблизительно 1,5 граммов.

119. Способ по пп. 1 или 2, или 6, или 7, отличающийся тем, что среда для

культивирования клеток предоставлена в контейнере, выбранном из группы, состоящей из G-контейнера и Xuri cellbag.

120. Способ по любому из пп. 1-119, отличающийся тем, что концентрация IL-2 составляет от приблизительно 10000 МЕ/мл до приблизительно 5000 МЕ/мл.

121. Способ по любому из пп. 1-120, отличающийся тем, что концентрация IL-2 составляет приблизительно 6000 МЕ/мл.

122. Способ по пп. 1 или 2, или 6, или 7, отличающийся тем, что пакет для инфузии на этапе (d) представляет собой пакет для инфузии, содержащий HypoThermosol.

123. Способ по п. 122, отличающийся тем, что среда для криоконсервации содержит диметилсульфоксид (ДМСО).

124. Способ по п. 123, отличающийся тем, что среда для криоконсервации содержит от 7% до 10% ДМСО.

125. Способ по пп. 1 или 2, или 6, или 7, отличающийся тем, что первый период на этапе (c) и второй период на этапе (c) каждый в отдельности проводят в течение периода 5 дней, 6 дней или 7 дней.

126. Способ по пп. 1 или 2, или 6, или 7, отличающийся тем, что первый период на этапе (c) проводят в течение периода 5 дней, 6 дней или 7 дней.

127. Способ по п. 1, отличающийся тем, что второй период на этапе (d) проводят в течение периода 7 дней, 8 дней или 9 дней.

128. Способ по пп. 1 или 2, или 6, или 7, отличающийся тем, что первый период на этапе (c) и второй период на этапе (c) каждый в отдельности проводят в течение периода 7 дней.

129. Способ по пп. 1 или 2, или 6, или 7, отличающийся тем, что этапы (a) - (f) проводят в течение периода от приблизительно 14 дней до приблизительно 16 дней.

130. Способ по пп. 1 или 2, или 6, или 7, отличающийся тем, что этапы (a) - (f) проводят в течение периода от приблизительно 15 дней до приблизительно 16 дней.

131. Способ по пп. 1 или 2, или 6, или 7, отличающийся тем, что этапы (a) - (f) проводят в течение периода приблизительно 14 дней.

132. Способ по пп. 1 или 2, или 6, или 7, отличающийся тем, что этапы (a) - (f) проводят в течение периода приблизительно 15 дней.

133. Способ по пп. 1 или 2, или 6, или 7, отличающийся тем, что этапы (a) - (f) проводят в течение периода приблизительно 16 дней.

134. Способ по п. 133, отличающийся тем, что этапы (a) - (f) и криоконсервацию проводят за 16 дней или менее.

135. Способ по любому из пп. 1-134, отличающийся тем, что терапевтическая популяция TIL, собранная на этапе (f), содержит достаточное количество TIL для терапевтически эффективной дозировки TIL.

136. Способ по п. 135, отличающийся тем, что количество TIL, достаточное для терапевтически эффективной дозировки, составляет от приблизительно $2,3\times10^{10}$ до приблизительно $13,7\times10^{10}$.

137. Способ по любому из пп. 1-136, отличающийся тем, что контейнер на этапе (c) больше, чем контейнер на этапе (b).

138. Способ по любому из пп. 1-137, отличающийся тем, что третья популяция TIL на этапе (d) обеспечивает повышенную эффективность, повышенную продукцию интерферона-гамма и/или повышенную поликлональность.

139. Способ по любому из пп. 1-138, отличающийся тем, что третья популяция TIL на этапе (d) обеспечивает по меньшей мере в 1-5 или более раз более высокую продукцию интерферона-гамма по сравнению с TIL, полученными с помощью процесса, длящегося более 16 дней.

140. Способ по любому из пп. 1-139, отличающийся тем, что эффекторные Т-клетки и/или Т-клетки центральной памяти, полученные из третьей популяции TIL из этапа (d), демонстрируют повышенную экспрессию CD8 и CD28 относительно эффекторных Т-клеток и/или Т-клеток центральной памяти, полученных из второй популяции клеток из этапа (c).

141. Способ по любому из пп. 1-140, отличающийся тем, что TIL из этапа (f) вводят пациенту путем инфузии.

142. Способ лечения субъекта, имеющего рак, включающий введение подвергнутых экспансии опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов (TIL), и включающий:

(a) получение и/или прием первой популяции TIL из опухоли, резецированной у субъекта, путем обработки образца опухоли, полученного от указанного субъекта, с получением множества фрагментов опухоли;

(b) отбор положительных по PD-1 TIL из первой популяции TIL из этапа (a) с получением обогащенной по PD-1 популяции TIL;

(c) проведение примирующей первой экспансии путем культивирования указанной обогащенной по PD-1 популяции TIL в среде для культивирования клеток, содержащей IL-2, OKT-3 и антигенпрезентирующие клетки (АПК), с получением второй популяции TIL, где примирующую первую экспансию проводят в контейнере, содержащем первую газопроницаемую площадь поверхности, где примирующую первую экспансию проводят в течение приблизительно от 1 до 7 дней с получением указанной второй популяции TIL, где указанная вторая популяция TIL по меньшей мере в 50 раз больше по численности, чем указанная первая популяция TIL;

(d) проведение быстрой второй экспансии путем добавления в среду для культивирования клеток указанной второй популяции TIL добавок IL-2, OKT-3 и АПК с получением третьей популяции TIL, где количество АПК, добавляемое при быстрой второй экспансии, по меньшей мере в два раза больше, чем количество АПК, добавляемое на этапе (b), где быструю вторую экспансию проводят в течение приблизительно от 1 до 11 дней с получением указанной третьей популяции TIL, где указанная третья популяция TIL представляет собой терапевтическую популяцию TIL, где быструю вторую экспансию проводят в контейнере, содержащем вторую газопроницаемую площадь поверхности;

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

(f) перенос собранной популяции TIL из этапа (d) в пакет для инфузии; и

(g) введение указанному субъекту терапевтически эффективной дозировки TIL из этапа (e).

143. Способ по п. 142, отличающийся тем, что количество TIL, достаточное для введения терапевтически эффективной дозировки на этапе (g), составляет от приблизительно $2,3\times10^{10}$ до приблизительно $13,7\times10^{10}$.

144. Способ по п. 142 или п. 143, отличающийся тем, что указанные положительные по PD-1 TIL представляют собой PD-1high TIL.

145. Способ по любому из пп. 142-144, отличающийся тем, что отбор на этапе (b) включает этапы (i) воздействия на первую популяцию TIL избытка моноклонального антитела IgG4 к PD-1, которое связывается с PD-1 через N-концевую петлю за пределами домена IgV PD-1, (ii) добавления избытка антитела к IgG4, конъюгированного с флуорофором, и (iii) проведения проточной сортировки клеток на основе флуорофора с получением обогащенной по PD-1 популяции TIL.

146. Способ по п. 145, отличающийся тем, что моноклональное антитело IgG4 к PD-1 представляет собой ниволумаб или его варианты, фрагменты или конъюгаты.

147. Способ по п. 146, отличающийся тем, что антитело к IgG4 представляет собой клон к IgG4 человека, клон HP6023.

148. Способ по п. 147, отличающийся тем, что антигенпрезентирующие клетки (АПК) представляют собой МНПК.

149. Способ по любому из пп. 145-148, отличающийся тем, что до введения терапевтически эффективной дозировки TIL-клеток на этапе (g) пациенту вводили режим немиелоаблативной лимфодеплеции.

150. Способ по п. 151, отличающийся тем, что режим немиелоаблативной лимфодеплеции включает этапы введения циклофосфамида в дозе 60 мг/м^2/сут в течение двух дней с последующим введением флударабина в дозе 25 мг/м^2/сут в течение пяти дней.

151. Способ по любому из пп. 145-150, дополнительно включающий этап лечения пациента с использованием высокодозового режима IL-2, начиная со следующего дня после введения пациенту TIL-клеток на этапе (g).

152. Способ по п. 151, отличающийся тем, что высокодозовый режим IL-2 включает 600000 или 720000 МЕ/кг, вводимых в виде 15-минутной внутривенной болюсной инфузии каждые восемь часов до достижения толерантности.

153. Способ по любому из пп. 145-152, отличающийся тем, что третья популяция TIL на этапе (c) обеспечивает повышенную эффективность, повышенную продукцию интерферона-гамма и/или повышенную поликлональность.

154. Способ по любому из пп. 145-153, отличающийся тем, что третья популяция TIL на этапе (d) обеспечивает по меньшей мере в 1-5 или более раз более высокую продукцию интерферона-гамма по сравнению с TIL, полученными с помощью процесса, длящегося более 16 дней.

155. Способ по любому из пп. 145-154, отличающийся тем, что эффекторные Т-

клетки и/или Т-клетки центральной памяти, полученные из третьей популяции TIL из этапа (d), демонстрируют повышенную экспрессию CD8 и CD28 относительно эффекторных Т-клеток и/или Т-клеток центральной памяти, полученных из второй популяции клеток из этапа (c).

156. Способ по любому из пп. 1-155, отличающийся тем, что рак выбран из группы, состоящей из меланомы, рака яичника, рака шейки матки, немелкоклеточного рака легкого (НМРЛ), рака легкого, рака мочевого пузыря, рака молочной железы, рака, вызванного вирусом папилломы человека, рака головы и шеи (включая плоскоклеточную карциному головы и шеи (ПКГШ)), глиобластомы (включая GBM), рака желудочно-кишечного тракта, рака почки и почечно-клеточной карциномы.

157. Способ по любому из пп. 1-156, отличающийся тем, что рак выбран из группы, состоящей из меланомы, ПКГШ, рака шейки матки, НМРЛ, глиобластомы (включая GBM) и рака желудочно-кишечного тракта.

158. Способ по любому из пп. 1-157, отличающийся тем, что рак представляет собой меланому.

159. Способ по любому из пп. 1-158, отличающийся тем, что рак представляет собой ПКГШ.

160. Способ по любому из пп. 1-159, отличающийся тем, что рак представляет собой рак шейки матки.

161. Способ по любому из пп. 1-160, отличающийся тем, что рак представляет собой НМРЛ.

162. Способ по любому из пп. 1-161, отличающийся тем, что рак представляет собой глиобластому (включая GBM).

163. Способ по любому из пп. 1-162, отличающийся тем, что рак представляет собой рак желудочно-кишечного тракта.

164. Способ по любому из пп. 1-163, отличающийся тем, что рак представляет собой гипермутированный рак.

165. Способ по любому из пп. 1-164, отличающийся тем, что рак представляет собой гипермутированный рак у детей.

166. Способ по любому из пп. 1-165, отличающийся тем, что контейнер представляет собой GREX-10.

167. Способ по любому из пп. 1-166, отличающийся тем, что закрытый контейнер включает GREX-100.

168. Способ по любому из пп. 1-167, отличающийся тем, что закрытый контейнер включает GREX-500.

169. Способ по любому из пп. 1-168, отличающийся тем, что субъект ранее получал лечение антителом к PD-1.

170. Способ по любому из пп. 1-169, отличающийся тем, что субъект ранее не получал лечение антителом к PD-1.

171. Способ по любому из пп. 1-170, отличающийся тем, что на этапе (b)

положительные по PD-1 TIL выбирают из первой популяции TIL путем проведения этапа приведения первой популяции TIL в контакт с антителом к PD-1 с образованием первого комплекса антитела к PD-1 и TIL-клеток в первой популяции TIL, а затем проведения этапа выделения первого комплекса с получением обогащенной по PD-1 популяции TIL.

172. Способ по п. 165, отличающийся тем, что антитело к PD-1 содержит Fc-область, где после этапа образования первых комплексов и перед этапом выделения первого комплекса способ дополнительно включает этап приведения первого комплекса в контакт с антителом к Fc, которое связывается с Fc-областью антитела к PD-1 с образованием второго комплекса антитела к Fc и первого комплекса, и где этап выделения первого комплекса проводят путем выделения второго комплекса.

173. Способ по любому из пп. 1-172, отличающийся тем, что антитело к PD-1 для применения в отборе на этапе (b) выбрано из группы, состоящей из EH12.2H7, PD1.3.1, M1H4, ниволумаба (BMS-936558, Bristol-Myers Squibb; Opdivo®), пембролизумаба (ламбролизумаб, MK03475 или MK-3475, Merck; Keytruda®), H12.1, PD1.3.1, NAT 105, гуманизированного антитела к PD-1 JS001 (ShangHai JunShi), моноклонального антитела к PD-1 TSR-042 (Tesaro, Inc.), пидилизумаба (mAb к PD-1 CT-011, Medivation), моноклонального антитела к PD-1 BGB-A317 (BeiGene) и/или антитела к PD-1 SHR-1210 (ShangHai HengRui), моноклонального антитела REGN2810 человека (Regeneron), моноклонального антитела MDX-1106 человека (Bristol-Myers Squibb), гуманизированного антитела IgG4 к PD-1 PDR001 (Novartis) и RMP1-14 (крысиный IgG) - BioXcell, № по каталогу BP0146.

174. Способ по любому из пп. 1-173, отличающийся тем, что антитело к PD-1 для применения в отборе на этапе (b) представляет собой EH12.2H7.

175. Способ по любому из пп. 1-174, отличающийся тем, что антитело к PD-1 для применения в отборе на этапе (b) связывается с эпитопом, отличным от эпитопа, с которым связывается ниволумаб или пембролизумаб.

176. Способ по любому из пп. 1-175, отличающийся тем, что антитело к PD-1 для применения в отборе на этапе (b) связывается с тем же эпитопом, что и EH12.2H7 или ниволумаб.

177. Способ по любому из пп. 1-176, отличающийся тем, что антитело к PD-1 для применения в отборе на этапе (b) представляет собой ниволумаб.

178. Способ по любому из пп. 1-177, отличающийся тем, что субъект ранее получал лечение первым антителом к PD-1, где на этапе (b) положительные по PD-1 TIL отбирают путем приведения первой популяции TIL в контакт со вторым антителом к PD-1, и где связывание второго антитела к PD-1 с первой популяцией TIL не блокируется первым антителом к PD-1, переведенным в нерастворимую форму на первой популяции TIL.

179. Способ по пп. 1-177, отличающийся тем, что субъект ранее получал лечение первым антителом к PD-1, где на этапе (b) положительные по PD-1 TIL отбирают путем приведения первой популяции TIL в контакт со вторым антителом к PD-1, и где связывание второго антитела к PD-1 с первой популяцией TIL блокируется первым антителом к PD-1,

переведенным в нерастворимую форму на первой популяции TIL.

180. Способ по любому из пп. 1-177, отличающийся тем, что субъект ранее получал лечение первым антителом к PD1, где на этапе (b) положительные по PD-1 TIL отбирают путем проведения этапа приведения первой популяции TIL в контакт со вторым антителом к PD-1 с образованием первого комплекса второго антитела к PD-1 и первой популяции TIL, где связывание второго антитела к PD-1 с первой популяцией TIL не блокируется первым антителом к PD-1, переведенным в нерастворимую форму на первой популяции TIL, и затем проведения этапа выделения первого комплекса с получением обогащенной по PD-1 популяции TIL.

181. Способ по пп. 1-177, отличающийся тем, что первое антитело к PD-1 и второе антитело к PD-1 содержат Fc-область, где после этапа образования первого комплекса и перед этапом выделения первого комплекса способ дополнительно включает этап приведения первого комплекса в контакт с антителом к Fc, которое связывается с Fc-областью первого антитела к PD-1 и Fc-областью второго антитела к PD-1 с образованием второго комплекса антитела к Fc и первого комплекса, и где этап выделения первого комплекса проводят путем выделения второго комплекса.

182. Способ по любому из пп. 1-177, отличающийся тем, что субъект ранее получал лечение первым антителом к PD1, где на этапе (b) положительные по PD-1 TIL отбирают путем проведения этапа приведения первой популяции TIL в контакт со вторым антителом к PD-1 с образованием первого комплекса второго антитела к PD-1 и первой популяции TIL, где связывание второго антитела к PD-1 с положительными по PD-1 TIL блокируется первым антителом к PD-1, переведенным в нерастворимую форму на первой популяции TIL, где первое антитело к PD-1 и второе антитело к PD-1 содержат Fc-область, где после этапа образования первого комплекса и перед этапом получения обогащенной по PD-1 популяции TIL способ дополнительно включает этап приведения первого комплекса в контакт с антителом к Fc, которое связывается с Fc-областью второго антитела к PD-1 с образованием второго комплекса антитела к Fc и первого комплекса, и приведения первого антитела к PD-1, переведенного в нерастворимую форму на первой популяции TIL, в контакт с антителом к Fc с образованием третьего комплекса антитела к Fc и первого антитела к PD-1, переведенного в нерастворимую форму на первой популяции TIL, и проведения этапа выделения второго и третьего комплексов с получением обогащенной по PD-1 популяции TIL.

183. Терапевтическая популяция опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов (TIL), полученная из положительных по PD-1 клеток, отобранных из опухолевой ткани пациента, где терапевтическая популяция TIL обеспечивает повышенную эффективность и/или повышенную продукцию интерферона-гамма.

184. Терапевтическая популяция TIL по п. 183, которая обеспечивает повышенную продукцию интерферона-гамма.

185. Терапевтическая популяция TIL по п. 183 или п. 184, которая обеспечивает повышенную эффективность.

186. Терапевтическая популяция TIL по любому из пп. 183-185, отличающаяся тем, что терапевтическая популяция TIL способна обеспечивать по меньшей мере в один раз более высокую продукцию интерферона-гамма по сравнению с TIL, полученными с помощью процесса, длящегося более 16 дней.

187. Терапевтическая популяция TIL по любому из пп. 183-186, отличающаяся тем, что терапевтическая популяция TIL способна обеспечивать по меньшей мере в один раз более высокую продукцию интерферона-гамма по сравнению с TIL, полученными с помощью процесса, длящегося более 16-22 дней.

188. Способ по любому из пп. 1-187, отличающийся тем, что отбор положительных по PD-1 TIL из первой популяции TIL с получением обогащенной по PD-1 популяции TIL включает отбор популяции TIL из первой популяции TIL, которая содержит по меньшей мере от 11,27% до 74,4% положительных по PD-1 TIL.

189. Способ по любому из пп. 1-188, отличающийся тем, что этап отбора включает следующие этапы:

(i) воздействия на первую популяцию TIL и популяцию МНПК избытка моноклонального антитела IgG4 к PD-1, которое связывается с PD-1 через N-концевую петлю за пределами домена IgV PD-1,

(ii) добавления избытка антитела к IgG4, конъюгированного с флуорофором,

(iii) получения обогащенной по PD-1 популяции TIL на основе интенсивности флуорофора положительных по PD-1 TIL в первой популяции TIL по сравнению с интенсивностью в популяции МНПК, оцениваемых с помощью сортировки клеток с активированной флуоресценцией (FACS).

190. Способ по любому из пп. 1-189, отличающийся тем, что интенсивность флуорофора как в первой популяции, так и в популяции МНПК используют для настройки гейтов FACS для установления низкого, среднего и высокого уровней интенсивности, которые соответствуют отрицательным по PD-1 TIL, промежуточным по PD-1 TIL и положительным по PD-1 TIL, соответственно.

191. Способ по любому из пп. 1-190, отличающийся тем, что гейты FACS настраивают после этапа (a).

192. Способ по любому из пп. 1-4, отличающийся тем, что положительные по PD-1 TIL представляют собой PD-1high TIL.

193. Способ по любому из пп. 1-5, отличающийся тем, что по меньшей мере 80% обогащенной по PD-1 популяции TIL представляют собой положительные по PD-1 TIL.

194. Способ экспансии опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов (TIL) в терапевтическую популяцию TIL, включающий:

(a) получение и/или прием первой популяции TIL из опухоли, резецированной у субъекта, путем обработки образца опухоли, полученного от указанного субъекта, с получением множества фрагментов опухоли;

(b) отбор положительных по PD-1 TIL из первой популяции TIL из этапа (a) с получением обогащенной по PD-1 популяции TIL, где по меньшей мере от 10% до 80%

первой популяции TIL представляют собой положительные по PD-1 TIL;

(c) проведение примирующей первой экспансии путем культивирования указанной обогащенной по PD-1 популяции TIL в среде для культивирования клеток, содержащей IL-2, OKT-3 и антигенпрезентирующие клетки (АПК), с получением второй популяции TIL, где примирующую первую экспансию проводят в контейнере, содержащем первую газопроницаемую площадь поверхности, где примирующую первую экспансию проводят в течение первого периода приблизительно от 1 до 7/8 дней с получением указанной второй популяции TIL, где указанная вторая популяция TIL больше по численности, чем указанная первая популяция TIL;

(d) проведение быстрой второй экспансии путем добавления в среду для культивирования клеток указанной второй популяции TIL добавок IL-2, OKT-3 и АПК с получением третьей популяции TIL, где количество АПК, добавляемое при быстрой второй экспансии, по меньшей мере в два раза больше, чем количество АПК, добавляемое на этапе (b), где быструю вторую экспансию проводят в течение второго периода приблизительно от 1 до 11 дней с получением указанной третьей популяции TIL, где указанная третья популяция TIL представляет собой терапевтическую популяцию TIL, где быструю вторую экспансию проводят в контейнере, содержащем вторую газопроницаемую площадь поверхности;

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

(f) перенос собранной популяции TIL из этапа (e) в пакет для инфузии.

195. Способ по п. 194, отличающийся тем, что отбор на этапе (b) включает следующие этапы:

(i) воздействия на первую популяцию TIL и популяцию МНПК избытка моноклонального антитела IgG4 к PD-1, которое связывается с PD-1 через N-концевую петлю за пределами домена IgV PD-1,

(ii) добавления избытка антитела к IgG4, конъюгированного с флуорофором,

(iii) получения обогащенной по PD-1 популяции TIL на основе интенсивности флуорофора положительных по PD-1 TIL в первой популяции TIL по сравнению с интенсивностью в популяции МНПК, оцениваемых с помощью сортировки клеток с активированной флуоресценцией (FACS).

196. Способ по любому из пп. 194-195, отличающийся тем, что интенсивность флуорофора как в первой популяции, так и в популяции МНПК используют для настройки гейтов FACS для установления низкого, среднего и высокого уровней интенсивности, которые соответствуют отрицательным по PD-1 TIL, промежуточным по PD-1 TIL и положительным по PD-1 TIL, соответственно.

197. Способ по любому из пп. 194-196, отличающийся тем, что гейты FACS настраивают после этапа (a).

198. Способ по любому из пп. 194-197, отличающийся тем, что положительные по PD-1 TIL представляют собой PD-1high TIL.

199. Способ по любому из пп. 194-198, отличающийся тем, что по меньшей мере

80% обогащенной по PD-1 популяции TIL представляют собой положительные по PD-1 TIL.

200. Способ по любому из пп. 194-199, отличающийся тем, что третья популяция TIL содержит по меньшей мере приблизительно 1×10^8 TIL в контейнере.

201. Способ по любому из пп. 194-200, отличающийся тем, что третья популяция TIL содержит по меньшей мере приблизительно 1×10^9 TIL в контейнере.

202. Способ по любому из пп. 194-201, отличающийся тем, что количество обогащенных по PD-1 TIL в примирующей первой экспансии составляет от приблизительно 1×10^4 до приблизительно 1×10^6.

203. Способ по любому из пп. 194-202, отличающийся тем, что количество обогащенных по PD-1 TIL в примирующей первой экспансии составляет от приблизительно 5×10^4 до приблизительно 1×10^6.

204. Способ по любому из пп. 194-203, отличающийся тем, что количество обогащенных по PD-1 TIL в примирующей первой экспансии составляет от приблизительно 2×10^5 до приблизительно 1×10^6.

205. Способ по любому из пп. 194-204, дополнительно включающий этап криоконсервации первой популяции TIL из опухоли, резецированной у субъекта, перед проведением этапа (а).

По доверенности

Процесс 2A: приблизительно 22 дня от этапа A до E	Процесс GEN 3: приблизительно 14-18 дней от этапа A до E
ЭТАП A Получение образца опухоли пациента (необязательно может быть заморожен перед этапом B; необязательно образец опухоли может представлять собой образец толстоигольной/малой биопсии)	**ЭТАП A** Получение образца опухоли пациента (необязательно может быть заморожен перед этапом B)
ЭТАП B Первая экспансия (физическая фрагментация на по меньшей мере 40 фрагментов на контейнер, выращивание в течение приблизительно от 3 до 14 дней со средой, содержащей IL-2)	**ЭТАП B** Примирующая первая экспансия (физическая фрагментация на не более чем 60 фрагментов на контейнер, выращивание в течение приблизительно от 1 до 7/8 дней со средой, содержащей IL-2, OKT-3 и необязательно антигенпрезентирующие фидерные клетки)
ЭТАП C Переход от первой экспансии ко второй экспансии (с этапа B TIL переходят непосредственно на этап D, необязательно в день 11 этапа B)	**ЭТАП C** Переход от примирующей первой экспансии к быстрой второй экспансии (с этапа B TIL переходят непосредственно на этап D в день 7/8)
ЭТАП D Вторая экспансия (TIL выращивают в среде для выращивания, содержащей IL-2, OKT-3 и антигенпрезентирующие фидерные клетки в закрытом контейнере)	**ЭТАП D** Быстрая вторая экспансия (TIL выращивают в среде для выращивания, содержащей IL-2, OKT-3 и 2X антигенпрезентирующих фидерных клеток; в дни 10-11 проводят масштабирование и добавляют дополнительный IL-2)
ЭТАП E Сбор TIL с этапа D (TIL собирают с помощью закрытой системы)	**ЭТАП E** Сбор TIL с этапа D
ЭТАП F Приготовление готового препарата и/или перенос в пакет для инфузии (необязательная криоконсервация)	**ЭТАП F** Приготовление готового препарата и/или перенос в пакет для инфузии (необязательная криоконсервация)

ФИГ. 1A

Процесс GEN 3: приблизительно 14-18 дней от этапа A до E

ЭТАП A

Получение образца опухоли пациента
(необязательно может быть заморожен перед этапом B)

ЭТАП B

Примирующая первая экспансия
(физическая фрагментация на не более чем 60 фрагментов на контейнер, выращивание в течение приблизительно от 1 до 7/8 дней со средой, содержащей IL-2, OKT-3 и необязательно антигенпрезентирующие фидерные клетки)

ЭТАП C

Переход от примирующей первой экспансии к быстрой второй экспансии
(с этапа B TIL переходят непосредственно на этап D в день 7/8)

ЭТАП D

Быстрая вторая экспансия
(TIL выращивают в среде для выращивания, содержащей IL-2, OKT-3 и 2X антигенпрезентирующих фидерных клеток; в дни 10-11 проводят масштабирование и добавляют дополнительный IL-2)

ЭТАП E

Сбор TIL с этапа D

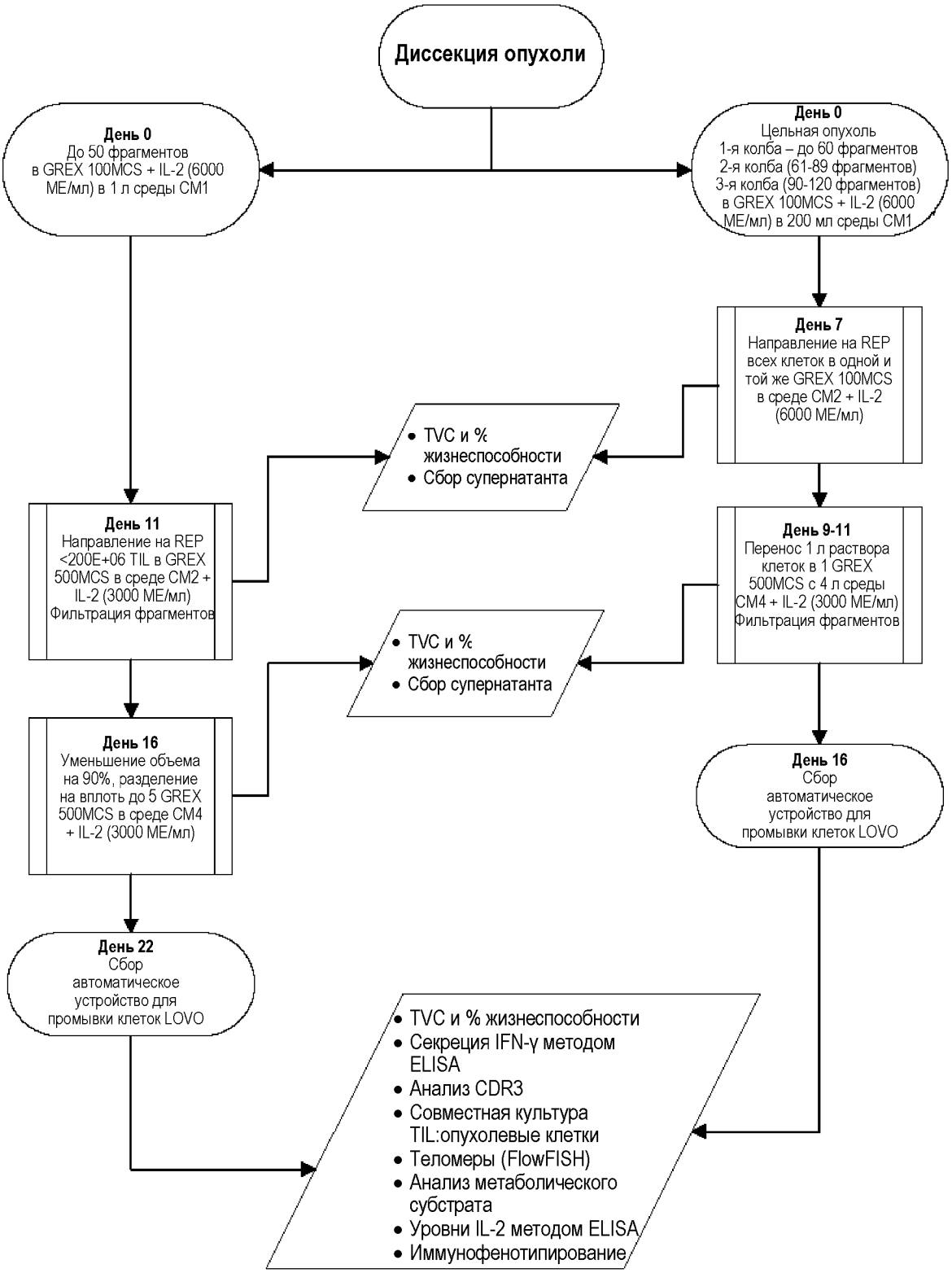
ЭТАП F

Приготовление готового препарата и/или перенос в пакет для инфузии
(необязательная криоконсервация)

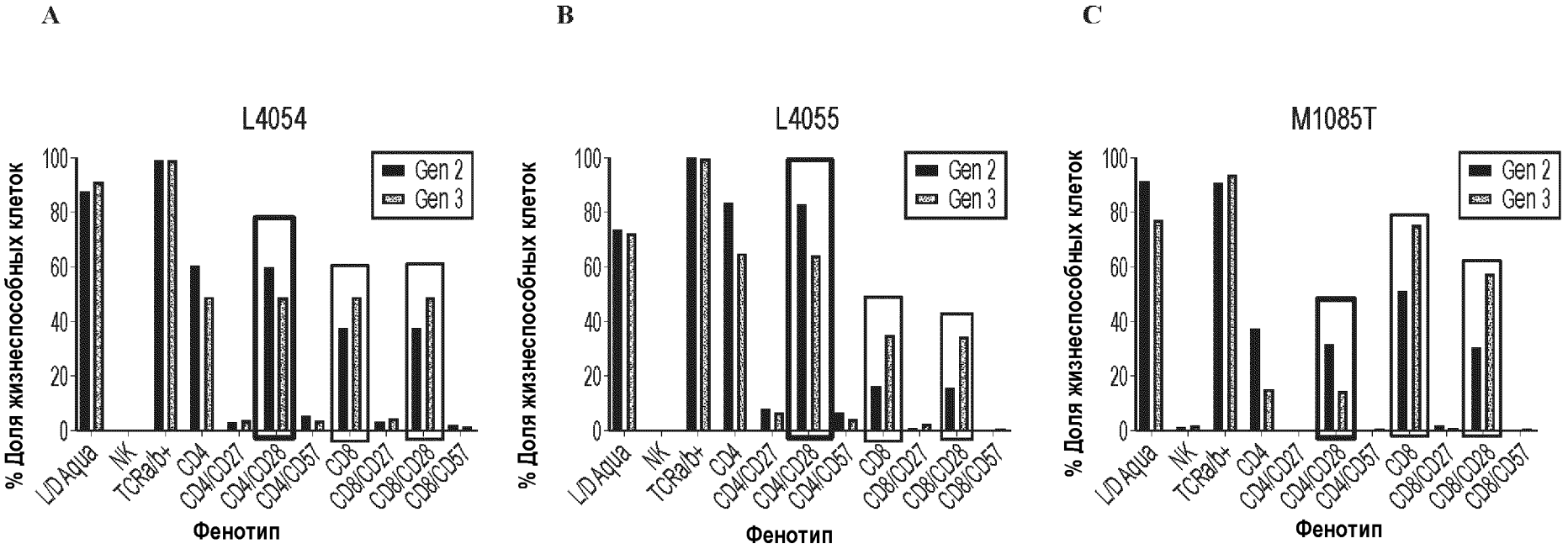
ФИГ. 1B

Вариант осуществления GEN 3.0: приблизительно 14-18 дней от этапа A до E	**Вариант осуществления GEN 3.1 контроль: приблизительно 14-18 дней от этапа A до E**	**Вариант осуществления GEN 3.1 Тест/F: приблизительно 14-18 дней от этапа A до E**
ЭТАП A Получение образца опухоли пациента (необязательно может быть заморожен перед этапом B)	**ЭТАП A** Получение образца опухоли пациента (необязательно может быть заморожен перед этапом B)	**ЭТАП A** Получение образца опухоли пациента (необязательно может быть заморожен перед этапом B)
ЭТАП B Примирующая первая экспансия (физическая фрагментация на не более чем 60 фрагментов на контейнер, выращивание в течение приблизительно от 1 до 7/8 дней со средой, содержащей IL-2)	**ЭТАП B** Примирующая первая экспансия (физическая фрагментация на не более чем 60 фрагментов на контейнер, выращивание в течение приблизительно от 1 до 7/8 дней со средой, содержащей IL-2 и OKT-3)	**ЭТАП B** Примирующая первая экспансия (физическая фрагментация на не более чем 60 фрагментов на контейнер, выращивание в течение приблизительно от 1 до 7/8 дней со средой, содержащей IL-2, OKT-3 и антигенпрезентирующие фидерные клетки)
ЭТАП C Переход от примирующей первой экспансии к быстрой второй экспансии (с этапа B TIL переходят непосредственно на этап D в день 7/8)	**ЭТАП C** Переход от примирующей первой экспансии к быстрой второй экспансии (с этапа B TIL переходят непосредственно на этап D в день 7/8)	**ЭТАП C** Переход от примирующей первой экспансии к быстрой второй экспансии (с этапа B TIL переходят непосредственно на этап D в день 7/8)
ЭТАП D Быстрая вторая экспансия (TIL выращивают в среде для выращивания, содержащей IL-2, OKT-3 и антигенпрезентирующие фидерные клетки; в дни 10-11 проводят масштабирование и добавляют дополнительный IL-2)	**ЭТАП D** Быстрая вторая экспансия (TIL выращивают в среде для выращивания, содержащей IL-2, OKT-3 и 2X антигенпрезентирующих фидерных клеток; в дни 10-11 проводят масштабирование и добавляют дополнительный IL-2)	**ЭТАП D** Быстрая вторая экспансия (TIL выращивают в среде для выращивания, содержащей IL-2, OKT-3 и 2X антигенпрезентирующих фидерных клеток; в дни 10-11 проводят масштабирование и добавляют дополнительный IL-2)
ЭТАП E Сбор TIL с этапа D	**ЭТАП E** Сбор TIL с этапа D	**ЭТАП E** Сбор TIL с этапа D
ЭТАП F Приготовление готового препарата и/или перенос в пакет для инфузии (необязательная криоконсервация)	**ЭТАП F** Приготовление готового препарата и/или перенос в пакет для инфузии (необязательная криоконсервация)	**ЭТАП F** Приготовление готового препарата и/или перенос в пакет для инфузии (необязательная криоконсервация)

ФИГ. 1C

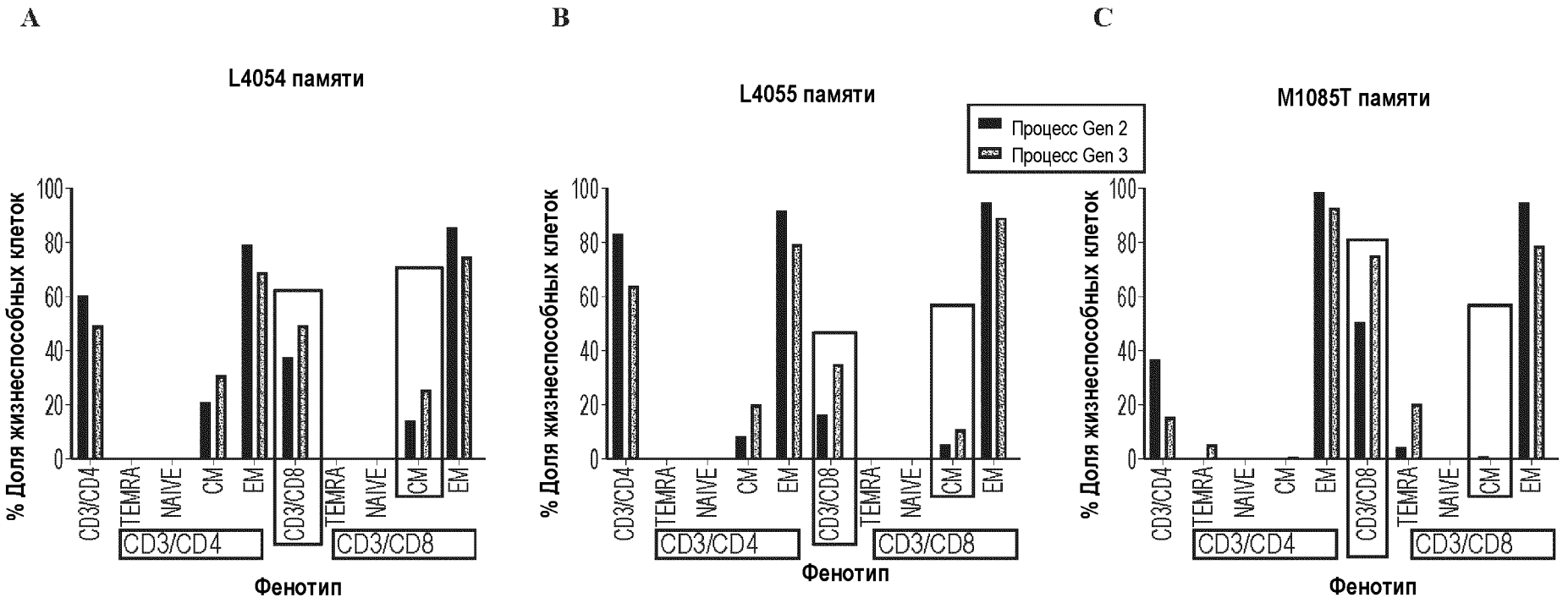

Диссекция опухоли
День 0
До 50 фрагментов в GREX 100MCS + IL-2 (6000 МЕ/мл) в 1 л среды CM1
День 0
Цельная опухоль
1-я колба – до 60 фрагментов
2-я колба (61-89 фрагментов)
3-я колба (90-120 фрагментов)
в GREX 100MCS + IL-2 (6000 МЕ/мл) в 200 мл среды CM1
День 7
Направление на REP всех клеток в одной и той же GREX 100MCS в среде CM2 + IL-2 (6000 МЕ/мл)
• TVC и % жизнеспособности
• Сбор супернатанта
День 11
Направление на REP <200E+06 TIL в GREX 500MCS в среде CM2 + IL-2 (3000 МЕ/мл)
Фильтрация фрагментов
День 9-11
Перенос 1 л раствора клеток в 1 GREX 500MCS с 4 л среды CM4 + IL-2 (3000 МЕ/мл)
Фильтрация фрагментов
• TVC и % жизнеспособности
• Сбор супернатанта
День 16
Уменьшение объема на 90%, разделение на вплоть до 5 GREX 500MCS в среде CM4 + IL-2 (3000 МЕ/мл)
День 16
Сбор автоматическое устройство для промывки клеток LOVO
День 22
Сбор автоматическое устройство для промывки клеток LOVO
• TVC и % жизнеспособности
• Секреция IFN-γ методом ELISA
• Анализ CDR3
• Совместная культура TIL:опухолевые клетки
• Теломеры (FlowFISH)
• Анализ метаболического субстрата
• Уровни IL-2 методом ELISA
• Иммунофенотипирование

ФИГ. 2



Идентификационный № опухоли	L4054		L4055		M1085T	
Процесс	**Gen 2**	**Gen 3**	**Gen 2**	**Gen 3**	**Gen 2**	**Gen 3**
Кол-во фрагментов	21	21	24	24	16	16

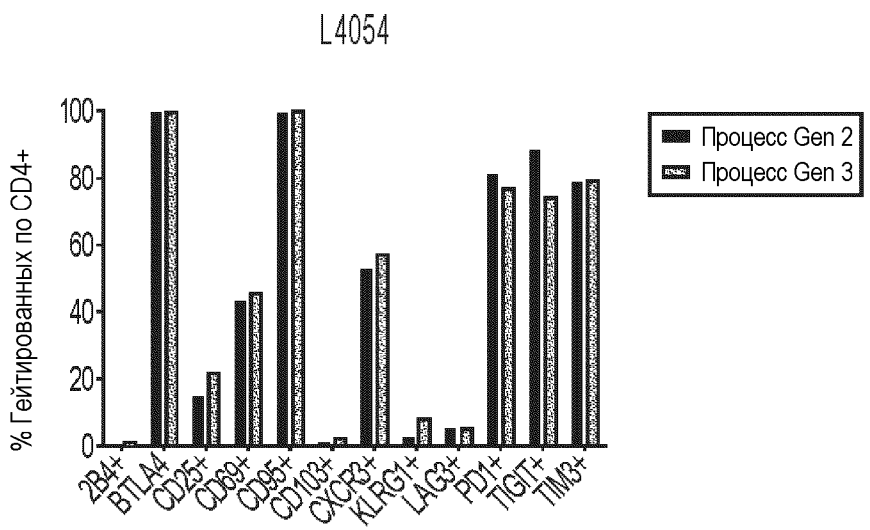
ФИГ. 3



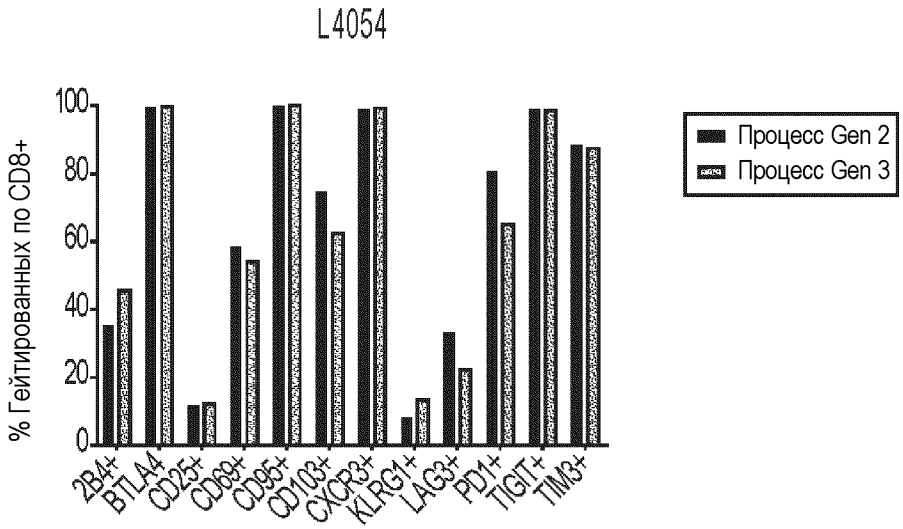
Идентификационный № опухоли	L4054		L4055		M1085T	
Процесс	**Gen 2**	**Gen 3**	**Gen 2**	**Gen 3**	**Gen 2**	**Gen 3**
Кол-во фрагментов	21	21	24	24	16	16

ФИГ. 4

A

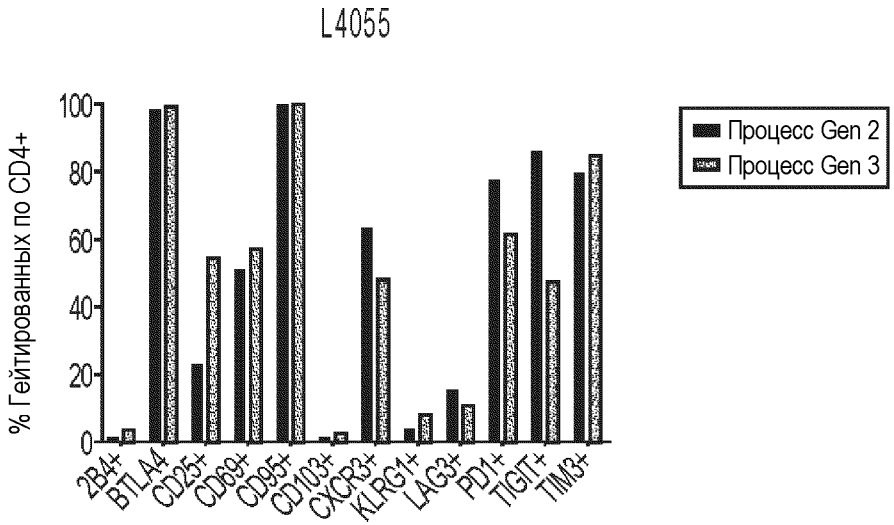

L4054
% Гейтированных по CD4+
100
80
60
40
20
0
2B4+
BTLA4
CD25+
CD69+
CD95+
CD103+
CXCR3+
KLRG1+
LAG3+
PD1+
TIGIT+
TIM3+
Процесс Gen 2
Процесс Gen 3

B

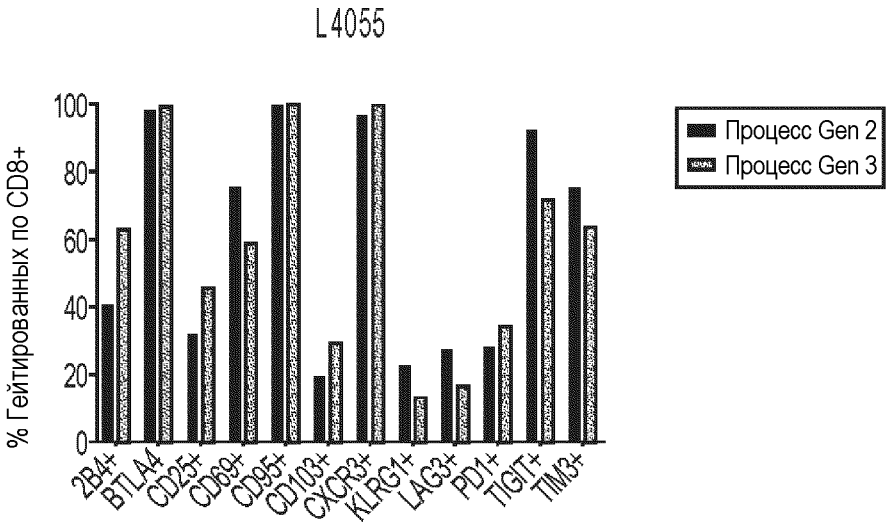

L4054
% Гейтированных по CD8+
100
80
60
40
20
0
2B4+
BTLA4
CD25+
CD69+
CD95+
CD103+
CXCR3+
KLRG1+
LAG3+
PD1+
TIGIT+
TIM3+
Процесс Gen 2
Процесс Gen 3

ФИГ. 5

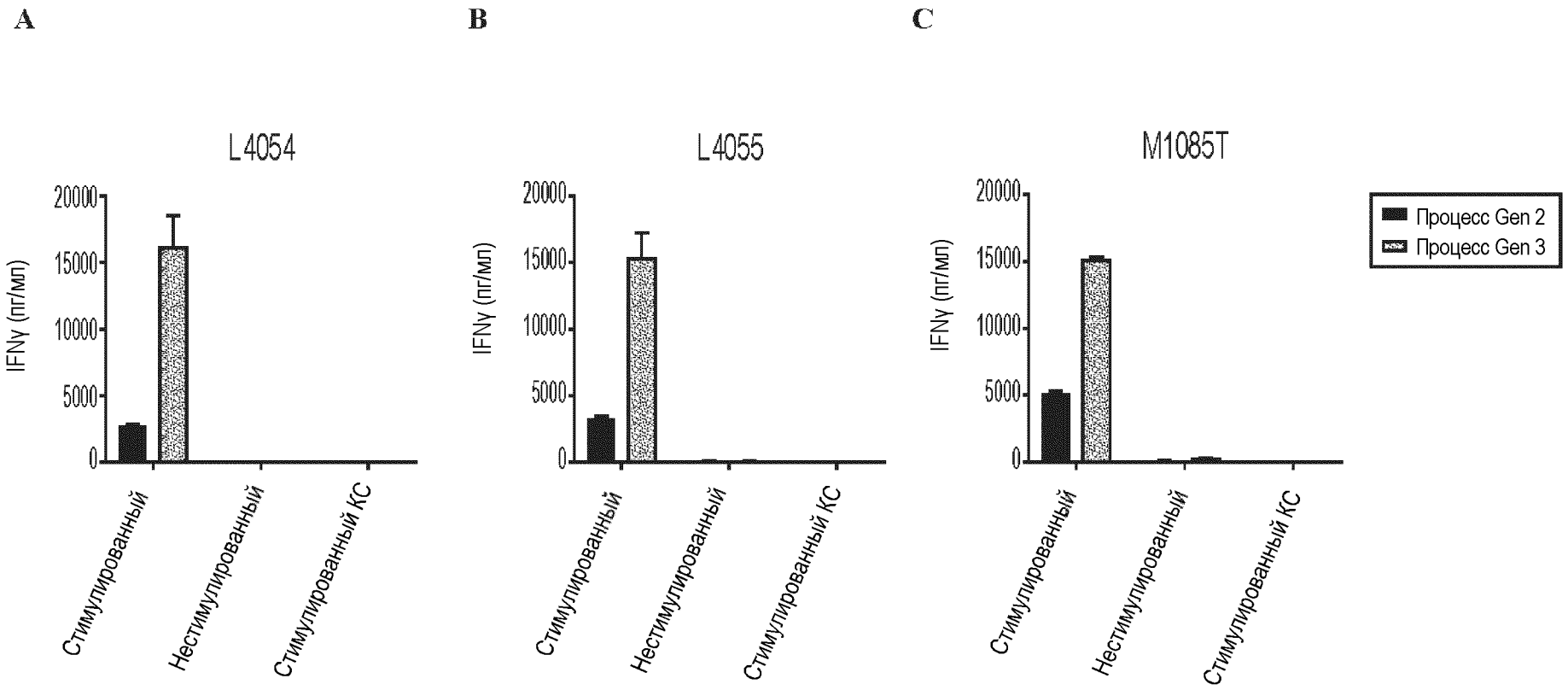
A


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

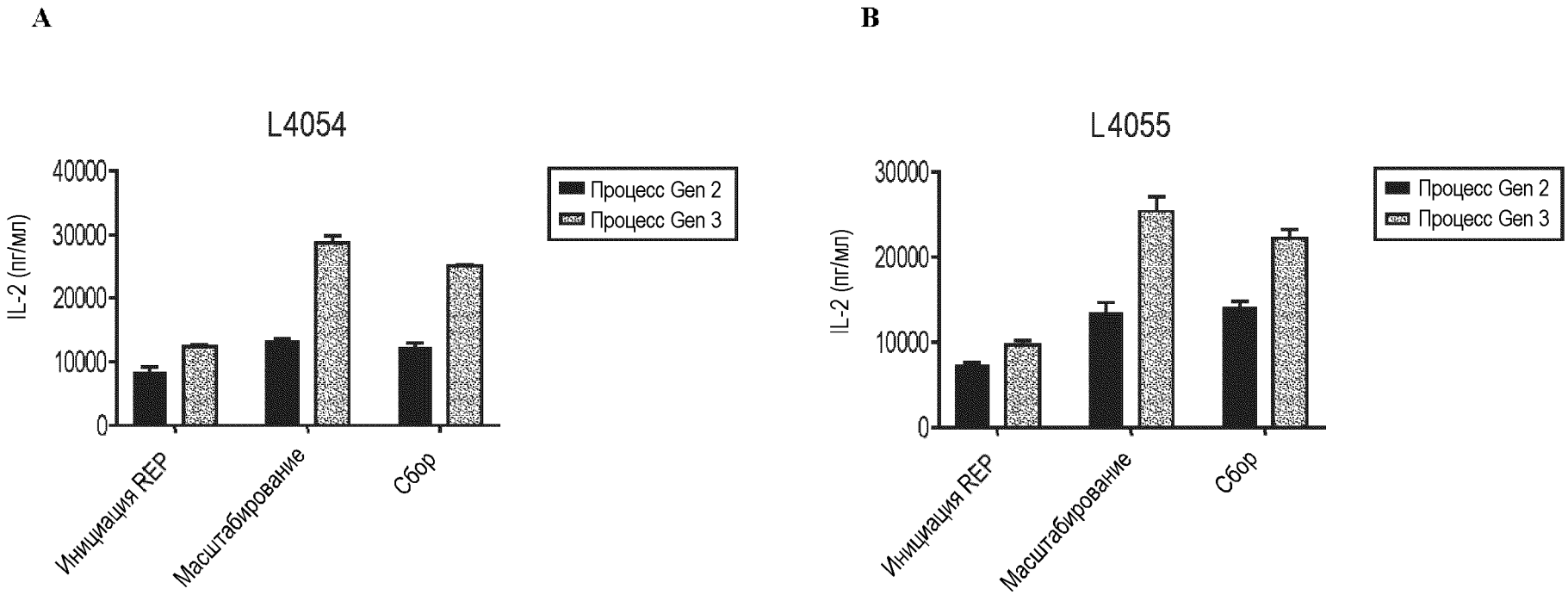
B


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

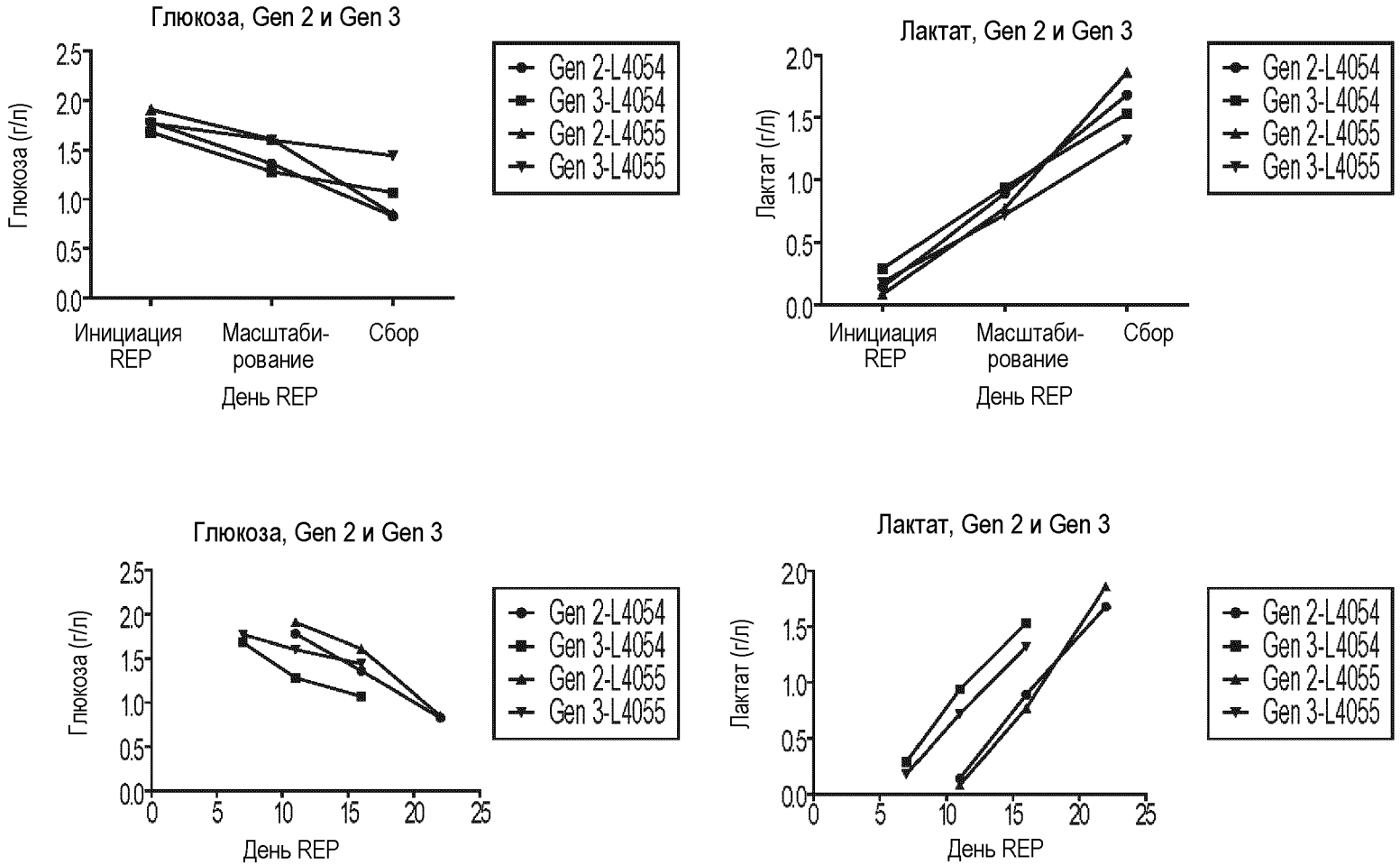
ФИГ. 6


A
B
C
L4054
L4055
M1085T
IFNγ (пг/мл)
20000
15000
10000
5000
0
Стимулированный
Нестимулированный
Стимулированный КС
Процесс Gen 2
Процесс Gen 3

ФИГ. 7


A
L4054
IL-2 (пг/мл)
40000
30000
20000
10000
0
Инициация REP
Масштабирование
Сбор
Процесс Gen 2
Процесс Gen 3
B
L4055
IL-2 (пг/мл)
30000
20000
10000
0
Инициация REP
Масштабирование
Сбор
Процесс Gen 2
Процесс Gen 3

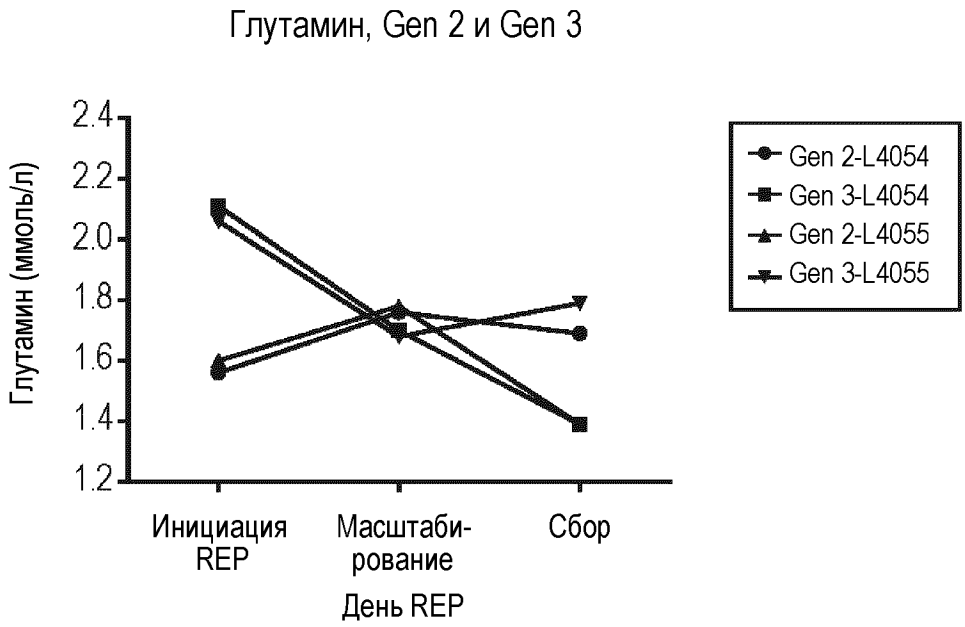
ФИГ. 8


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

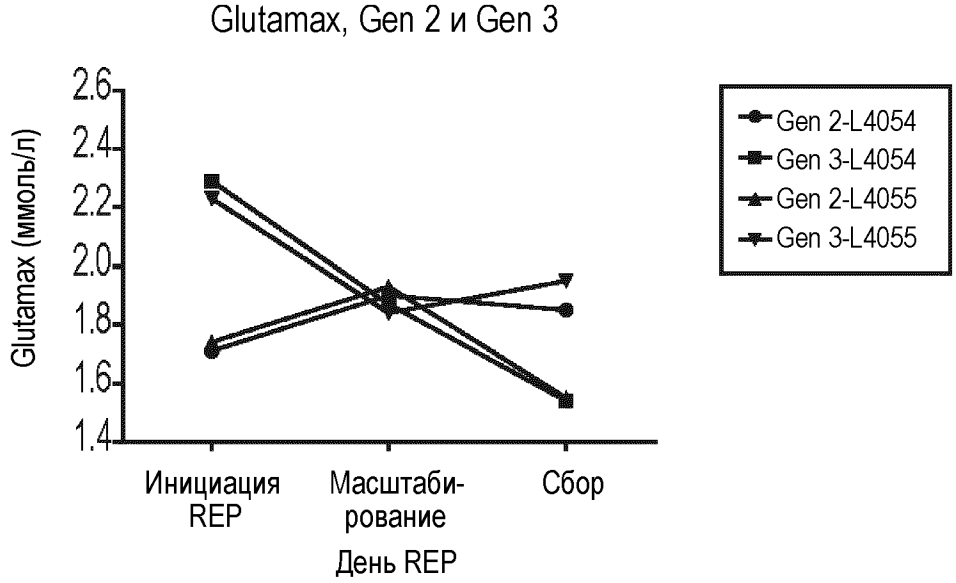
A **B**

ФИГ. 9

A

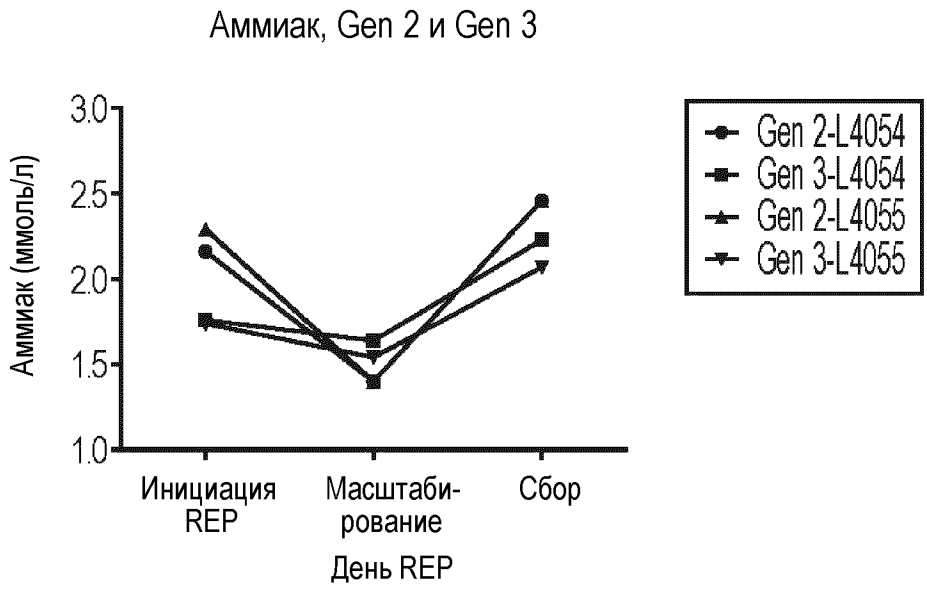

Глутамин, Gen 2 и Gen 3
Глутамин (ммоль/л)
2.4
2.2
2.0
1.8
1.6
1.4
1.2
Инициация REP
Масштаби-рование
Сбор
День REP
Gen 2-L4054
Gen 3-L4054
Gen 2-L4055
Gen 3-L4055

B

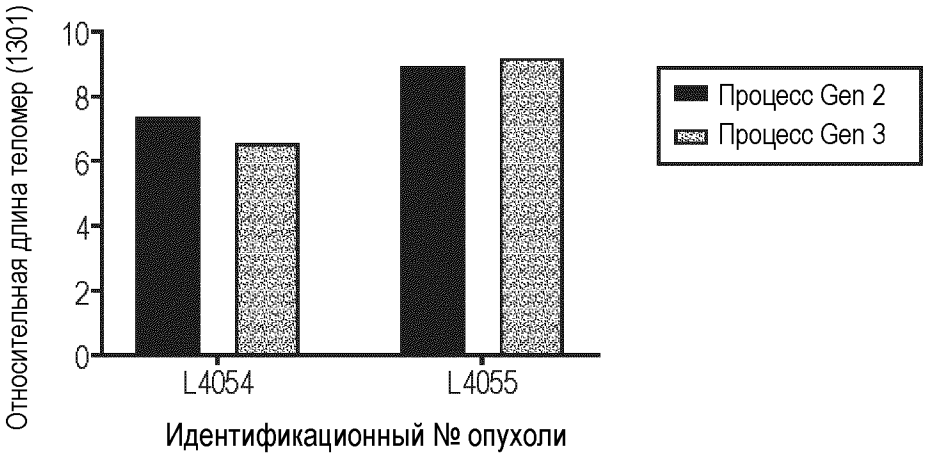

Glutamax, Gen 2 и Gen 3
Glutamax (ммоль/л)
2.6
2.4
2.2
2.0
1.8
1.6
1.4
Инициация REP
Масштаби-рование
Сбор
День REP
Gen 2-L4054
Gen 3-L4054
Gen 2-L4055
Gen 3-L4055

ФИГ. 10

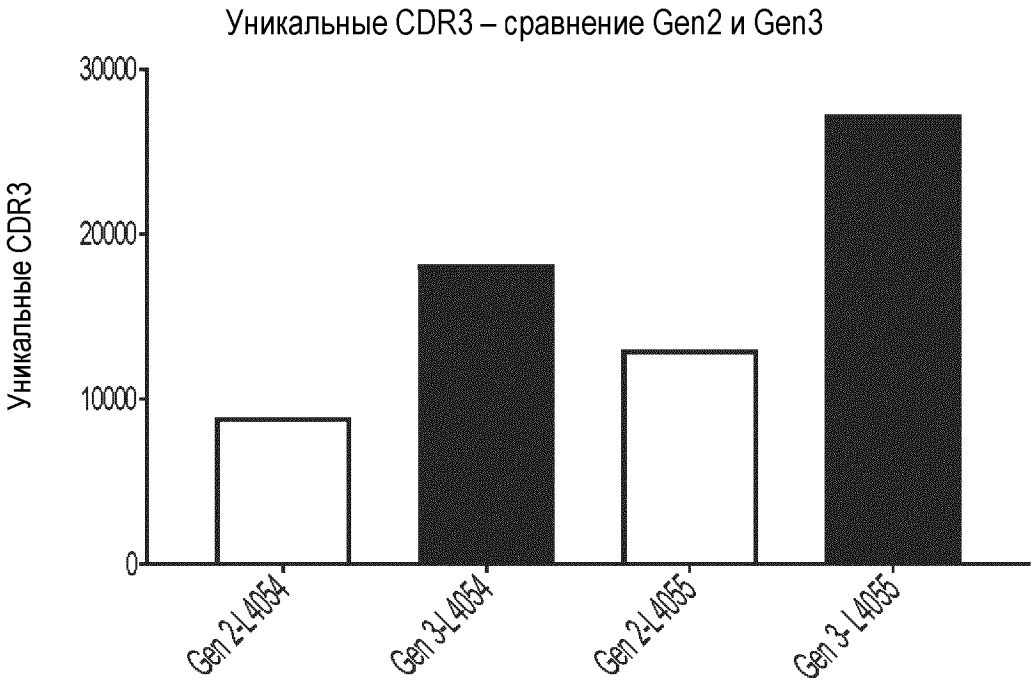
C


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

ФИГ. 10C


Относительная длина теломер (1301)
10
8
6
4
2
0
L4054
L4055
Идентификационный № опухоли
Процесс Gen 2
Процесс Gen 3

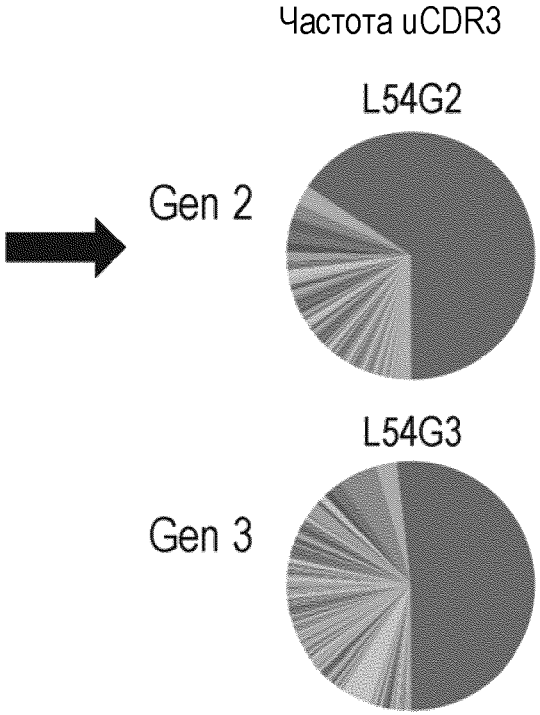
ФИГ. 11


Уникальные CDR3 – сравнение Gen2 и Gen3
Уникальные CDR3
30000
20000
10000
0
Gen 2-L4054
Gen 3-L4054
Gen 2-L4055
Gen 3-L4055

ФИГ. 12

Кол-во uCDR3 (% перекрытия)	Все uCDR3		Лучшие 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

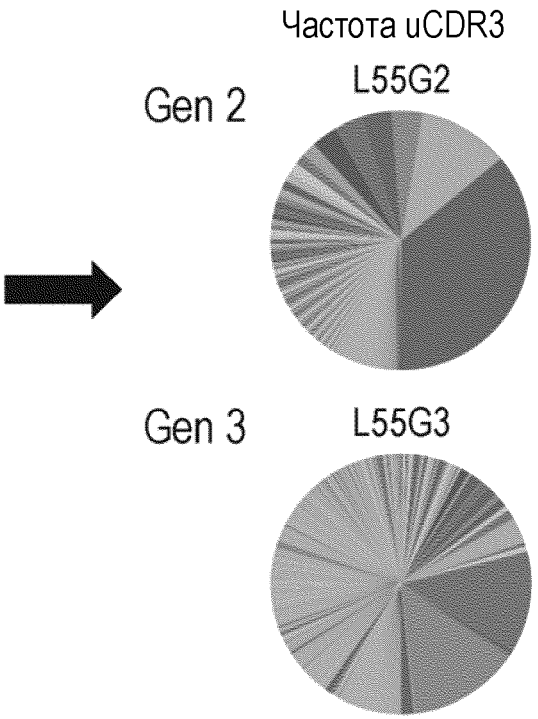
- 199 последовательностей являются общими для готового продукта Gen 3 и Gen 2, что соответствует 97,07% из лучших 80% уникальных последовательностей CDR3 из Gen 2, общих с готовым продуктом Gen 3.



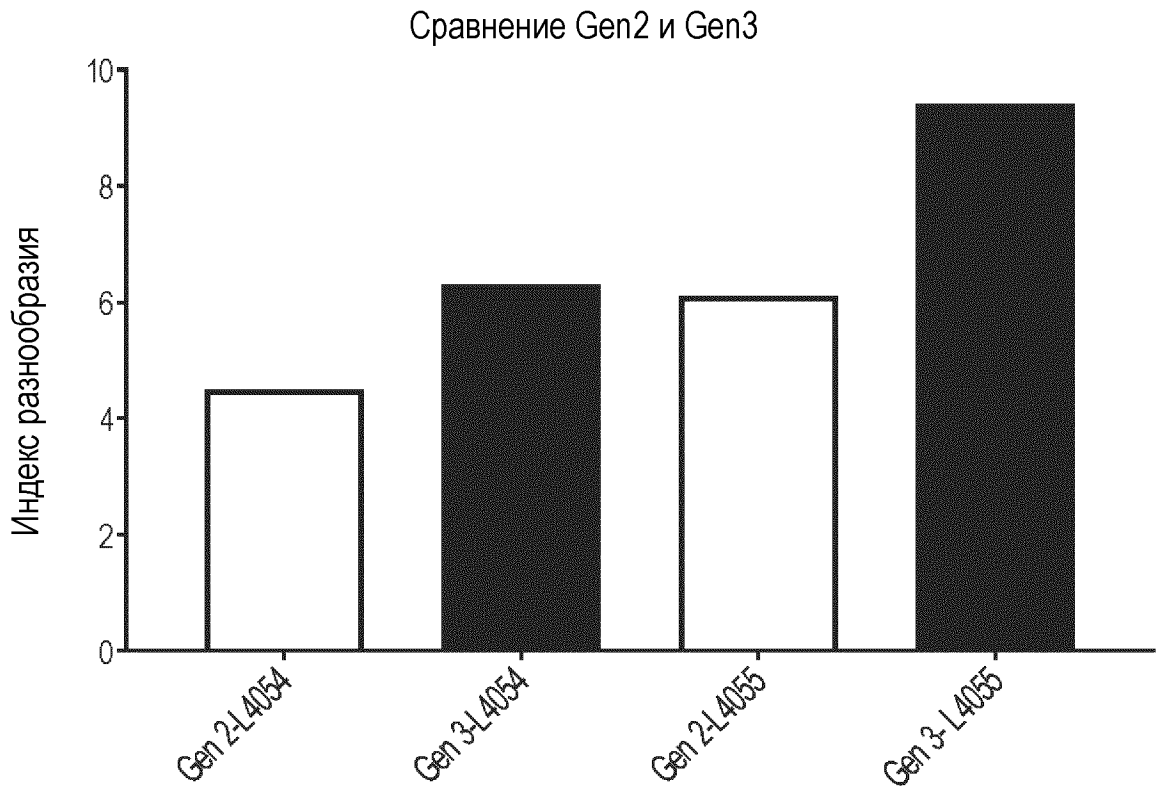
ФИГ. 13

Кол-во uCDR3 (% перекрытия)	Все uCDR3		Лучшие 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 готового продукта Gen 3 и Gen 2, что соответствует 99,45% из лучших 80% уникальных последовательностей CDR3 из Gen 2, общих с готовым продуктом Gen 3.



ФИГ. 14


Сравнение Gen2 и Gen3
Индекс разнообразия
10
8
6
4
2
0
Gen 2-L4054
Gen 3-L4054
Gen 2-L4055
Gen 3- L4055

ФИГ. 15

Количества клеток в день 7 – инициация REP в Gen 3

Объем (мл)		Количество 1 (клеток/мл)	Количество 2 (клеток/мл)	Количество 3 (клеток/мл)	Среднее (клеток/мл)	Среднее общее количество клеток* Объем
188	Всего	2.46E+05	2.28E+05	2.31E+05	2.35E+05	4.42E+07
	Живых	2.37E+05	2.27E+05	2.26E+05	2.30E+05	4.32E+07
	Мертвых	9.26E+03	7.03E+02	4.63E+03	4.86E+03	9.14E+05
	% Жизнесп-ти	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
	Живых	7.60E+04	7.54E+04	6.89E+04	7.34E+04	1.38E+07
	Мертвых	6.61E+03	4.63E+03	7.73E+03	6.32E+03	1.19E+06
	% Жизнесп-ти	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
	Живых	1.74E+04	2.80E+04	7.03E+03	1.75E+04	3.50E+06
	Мертвых	7.03E+03	1.40E+04	3.48E+03	8.17E+03	1.63E+06
	% Жизнесп-ти	71.20%	66.70%	66.90%	68.27%	

ФИГ. 16

Количества клеток в день 11 – инициация REP в Gen 2 и масштабирование в Gen 3

ID	Объем (мл)		Количество 1 (клеток/мл)	Количество 3 (клеток/мл)	Количество 2 (клеток/мл)	Среднее (клеток/мл)	Среднее общее количество клеток* Объем
Gen 3 №L4054 Первый цикл	1000	Всего	9.11E+05	1.01E+06	1.08E+06	1.00E+06	1.00E+09
		Живых	8.60E+05	9.34E+05	1.01E+06	9.35E+05	9.35E+08
		Мертвых	5.09E+04	7.49E+04	6.74E+04	6.44E+04	6.44E+07
		% Жизнесп-ти	94.40%	92.60%	93.70%	93.57%	
Gen 3 №L4055 Второй цикл	1000	Всего	8.56E+05	9.04E+05	8.81E+05	8.80E+05	8.80E+08
		Живых	8.24E+05	8.67E+05	8.42E+05	8.44E+05	8.44E+08
		Мертвых	8.17E+04	3.70E+04	3.87E+04	3.58E+04	3.58E+07
		% Жизнесп-ти	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
		Живых	1.68E+06	1.57E+06		1.63E+06	3.25E+08
		Мертвых	6.41E+05	6.79E+05		6.60E+05	1.32E+08
		% Жизнесп-ти	72.40%	69.90%		71.15%	
Gen 2 №L4054 Первый цикл	142	Всего	1.08E+06	9.84E+05	1.00E+06	1.02E+06	1.45E+08
		Живых	1.06E+06	9.71E+05	9.79E+05	1.00E+06	1.42E+08
		Мертвых	2.05E+04	1.26E+04	2.12E+04	1.81E+04	2.57E+06
		% Жизнесп-ти	98.10%	98.70%	97.90%	98.23%	
Gen 2 №L4055 Второй цикл	96	Всего	2.93E+05	3.05E+05	2.64E+05	2.87E+05	2.76E+07
		Живых	2.88E+05	2.96E+05	2.55E+05	2.80E+05	2.68E+07
		Мертвых	4.72E+03	9.14E+03	8.26E+03	7.37E+03	7.08E+05
		% Жизнесп-ти	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
		Живых	8.05E+04	4.21E+04		6.13E+04	1.23E+07
		Мертвых	1.04E+04	1.39E+04		1.22E+04	2.43E+06
		% Жизнесп-ти	88.50%	75.20%		81.85%	

ФИГ. 17

ID	Объем (мл)		Количество 1 (клеток/мл)	Количество 2 (клеток/мл)	Количество 3 (клеток/мл)	Среднее (клеток/мл)	Среднее общее кол-во клеток*Объем
Gen 3 №L4054 Первый цикл – до LOVO	1243.1	Всего	1.40E+07	1.46E+07		1.43E+07	1.78E+10
		Живых	1.32E+07	1.35E+07		1.34E+07	1.66E+10
		Мертвых	8.47E+05	1.12E+06		9.84E+05	1.22E+09
		% Жизнесп-ти	94.00%	92.40%		93.20%	
Gen 3 №L4054 Первый цикл – после LOVO	330	Всего	6.35E+07	6.07E+07		6.21E+07	2.05E+10
		Живых	5.72E+07	5.44E+07		5.58E+07	1.84E+10
		Мертвых	6.35E+06	6.27E+06		6.31E+06	2.08E+09
		% Жизнесп-ти	90.00%	89.70%		89.85%	

ID	Объем (мл)		Количество 1 (клеток/мл)	Количество 2 (клеток/мл)	Количество 3 (клеток/мл)	Среднее (клеток/мл)	Среднее общее кол-во клеток*Объем
Gen 3 №L4055 Второй цикл – до LOVO	1032.6	Всего	9.49E+06	1.05E+07		1.00E+07	1.03E+10
		Живых	8.90E+06	9.79E+06		9.35E+06	9.65E+09
		Мертвых	5.85E+05	6.75E+05		6.30E+05	6.51E+08
		% Жизнесп-ти	93.80%	93.60%		93.70%	
Gen 3 №L4055 Второй цикл – после LOVO	330	Всего	3.31E+07	2.82E+07	3.18E+07	3.07E+07	1.01E+10
		Живых	2.85E+07	2.46E+07	2.77E+07	2.66E+07	8.67E+09
		Мертвых	4.56+06	3.61+06	4.12E+06	4.09E+06	1.35E+09
		% Жизнесп-ти	86.20%	87.20%	87.10%	86.70%	

ID	Объем (мл)		Количество 1 (клеток/мл)	Количество 2 (клеток/мл)	Количество 3 (клеток/мл)	Среднее (клеток/мл)	Среднее общее кол-во клеток*Объем
Gen 3 №M1085T до LOVO	5000	Всего	2.26E+06	2.64E+06		2.45E+06	1.23E+10
		Живых	1.97E+06	2.31E+06		2.14E+06	1.07E+10
		Мертвых	2.85E+05	3.30E+05		3.08E+05	1.54E+09
		% Жизнесп-ти	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
		Живых	5.50E+07	4.74E+07		5.12E+07	7.68E+09
		Мертвых	7.70E+06	6.96E+06		7.33E+06	1.10E+09
		% Жизнесп-ти	87.70%	87.20%		87.45%	

ID	Объем (мл)		Количество 1 (клеток/мл)	Количество 2 (клеток/мл)	Количество 3 (клеток/мл)	Среднее (клеток/мл)	Среднее общее кол-во клеток*Объем
Gen 2 №L4054 Первый цикл	913	Всего	3.53E+06	4.30E+06		3.92E+06	3.57E+09
		Живых	3.35E+06	4.00E+06		3.68E+06	3.36E+09
		Мертвых	1.75E+05	3.03E+05		2.39E+05	2.18E+08
		% Жизнесп-ти	95.00%	93.00%		94.00%	
Gen 2 №L4054 Второй цикл	292	Всего	1.29E+07	1.36E+07		1.33E+07	3.87E+09
		Живых	1.16E+07	1.23E+07		1.20E+07	3.49E+09
		Мертвых	1.27E+06	1.23E+06		1.25E+06	3.65E+08
		% Жизнесп-ти	90.10%	90.90%		90.50%	
Gen 2 №M1085T	369	Всего	6.75E+06	6.98E+06		6.87E+06	2.53E+09
		Живых	5.22E+06	5.58E+06		5.40E+06	1.99E+09
		Мертвых	1.54E+06	1.40E+06		1.47E+06	5.42E+08
		% Жизнесп-ти	77.20%	79.90%		78.55%	

ФИГ. 18

ID	Объем (мл)		Количество 1 (клеток/мл)	Количество 2 (клеток/мл)	Количество 3 (клеток/мл)	Среднее (клеток/мл)	Среднее общее кол-во клеток*Объем
Gen 2 №L4054 Первый цикл – до LOVO	1385.7	Всего	3.55E+07	4.12E+07	4.03E+07	3.90E+07	5.40E+10
		Живых	3.26E+07	3.73E+07	3.67E+07	3.55E+07	4.92E+10
		Мертвых	2.93E+06	3.87E+06	3.59E+06	3.46E+06	4.80E+09
		% Жизнесп-ти	91.70%	90.60%	91.10%	91.13%	
Gen 2 №L4054 Первый цикл – после LOVO	330	Всего	1.70E+08	1.79E+08	1.68E+08	1.72E+08	5.69E+10
		Живых	1.49E+08	1.58E+08	1.48E+08	1.52E+08	5.01E+10
		Мертвых	2.16E+07	2.04E+07	2.00E+07	2.07E+07	6.82E+09
		% Жизнесп-ти	87.30%	88.60%	88.10%	87.95%	

ID	Объем (мл)		Количество 1 (клеток/мл)	Количество 2 (клеток/мл)	Количество 3 (клеток/мл)	Среднее (клеток/мл)	Среднее общее кол-во клеток*Объем
Gen 2 №L4055 Первый цикл – до LOVO	1968.2	Всего	3.15E+07	2.51E+07	2.97E+07	2.88E+07	5.66E+10
		Живых	2.89E+07	2.25E+07	2.72E+07	2.62E+07	5.16E+10
		Мертвых	2.57E+06	2.61E+06	2.52E+06	2.57E+06	5.05E+09
		% Жизнесп-ти	91.80%	89.60%	91.50%	90.97%	
Gen 2 №L4055 Первый цикл – после LOVO	330	Всего	2.33E+08	1.89E+08	1.53E+08	1.92E+08	6.33E+10
		Живых	2.03E+08	1.66E+08	1.33E+08	1.67E+08	5.52E+10
		Мертвых	3.00E+07	2.24E+07	1.94E+07	2.39E+07	7.90E+09
		% Жизнесп-ти	87.10%	88.10%	87.30%	87.50%	

ID	Объем (мл)		Количество 1 (клеток/мл)	Количество 2 (клеток/мл)	Количество 3 (клеток/мл)	Среднее (клеток/мл)	Среднее общее кол-во клеток*Объем
Gen 2 №M1085T – до LOVO	N/S	Всего				#DIV/0!	#DIV/0!
		Живых				#DIV/0!	#DIV/0!
		Мертвых				#DIV/0!	#DIV/0!
		% Жизнесп-ти				#DIV/0!	
Gen 2 №M1085T – после LOVO, до добавления CS10	150	Всего	8.51E+07	9.05E+07		8.78E+07	1.32E+10
		Живых	7.33E+07	7.79E+07		7.56E+07	1.13E+10
		Мертвых	1.18E+07	1.26E+07		1.22E+07	1.83E+09
		% Жизнесп-ти	86.10%	86.10%		86.10%	

Для L4054 Gen 2 подсчет клеток после LOVO был экстраполирован на 4 колбы, потому что был общим количеством в исследовании. 1 колба была загрязнена, и экстраполяция была сделана для в общей сложности = 6,67e+10

ФИГ. 19

	S1/S2/Все/Живые/Доля от Родит. (%)	S1/S2/Все/Жив./CD14+/Доля от Родит. (%)	S1/S2/Все/Жив./CD14-/CD3-/NK/Доля от нул. (%)	S1/S2/Все/Жив./CD14-/CD19/Доля от нул. (%)	S1/S2/Все/Жив./CD14-/TCRab/Доля от нул. (%)	S1/S2/Все/Жив./CD14-/TCRab/CD4/Доля от нул. (%)	S1/S2/Все/Жив./CD14-/TCRab/CD4/CD27/Доля от нул. (%)	S1/S2/Все/Жив./CD14-/TCRab/CD4/CD28/Доля от нул. (%)	S1/S2/Все/Жив./CD14-/TCRab/CD4/CD56/Доля от нул. (%)	S1/S2/Все/Жив./CD14-/TCRab/CD4/CD57/Доля от нул. (%)	S1/S2/Все/Жив./CD14-/TCRab/CD4/Q1: CCR7-PE-A-, CD45RA-AF700-A+/Доля от Родит. (%)	S1/S2/Все/Жив./CD14-/TCRab/CD4/Q2: CCR7-PE-A+, CD45RA-AF700-A+/Доля от Родит. (%)	S1/S2/Все/Жив./CD14-/TCRab/CD4/Q3: CCR7-PE-A+, CD45RA-AF700-A-/Доля от Родит. (%)	S1/S2/Все/Жив./CD14-/TCRab/CD4/Q4: CCR7-PE-A-, CD45RA-AF700-A-/Доля от Родит. (%)	S1/S2/Все/Жив./CD14-/TCRab/CD4/Q5: CD62L-B421-A-, CD45RA-AF700-A+/Доля от Родит. (%)	S1/S2/Все/Жив./CD14-/TCRab/CD4/Q6: CD62L-B421-A+, CD45RA-AF700-A+/Доля от Родит. (%)	S1/S2/Все/Жив./CD14-/TCRab/CD4/Q7: CD62L-B421-A+, CD45RA-AF700-A-/Доля от Родит. (%)	S1/S2/Все/Жив./CD14-/TCRab/CD4/Q8: CD62L-B421-A-, CD45RA-AF700-A-/Доля от Родит. (%)
											TEMRA	НАИВНЫЕ	CM	EM	TEMRA	НАИВНЫЕ	CM	EM
A1_gen2_1st.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_2nd.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_1st.fcs	90.4	0	0.197	1.72e-03	98.8	49.1	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_2nd.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_PBMC.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 Область включена для получения графика
TCRab+ = CD3+

S1/S2/Все/Жив./CD14-/TCRab/CD8/Доля от нул. (%)	S1/S2/Все/Жив./CD14-/TCRab/CD8/CD27/Доля от нул. (%)	S1/S2/Все/Жив./CD14-/TCRab/CD8/CD28/Доля от нул. (%)	S1/S2/Все/Жив./CD14-/TCRab/CD8/CD56/Доля от нул. (%)	S1/S2/Все/Жив./CD14-/TCRab/CD8/CD57/Доля от нул. (%)	S1/S2/Все/Живые/CD14-/TCRab/CD8/Q1: CCR7-PE-A-, CD45RA-AF700-A+/Доля от родит. (%)	S1/S2/Все/Живые/CD14-/TCRab/CD8/Q2: CCR7-PE-A+, CD45RA-AF700-A+/Доля от родит. (%)	S1/S2/Все/Жив./CD14-/TCRab/CD8/Q3: CCR7-PE-A+, CD45RA-AF700-A-/Доля от родит. (%)	S1/S2/Все/Жив./CD14-/TCRab/CD8/Q4: CCR7-PE-A-, CD45RA-AF700-A-/Доля от родит. (%)	S1/S2/Все/Жив./CD14-/TCRab/CD8/Q5: CD62L-BV421-A-, CD45RA-AF700-A+/Доля от родит. (%)	S1/S2/Все/Жив./CD14-/TCRab/CD8/Q6: CD62L-BV421-A+, CD45RA-AF700-A+/Доля от родит. (%)	S1/S2/Все/Жив./CD14-/TCRab/CD8/Q7: CD62L-BV421-A+, CD45RA-AF700-A-/Доля от родит. (%)	S1/S2/Все/Жив./CD14-/TCRab/CD8/Q8: CD62L-BV421-A-, CD45RA-AF700-A-/Доля от родит. (%)	S1/S2/Все/Жив./CD14-/TCRq d/Доля от родит. (%)
					TEMRA	НАИВНЫЕ	CM	EM	TEMRA	НАИВНЫЕ	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	43.20	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.	КС-стимулир. xG2	КС-стимулир. xG2	КС-стимулир. xG2	ID лунки
	1000	1000	1000	3	3	3	3	3	3	3	3	3	Конц-я/развед.
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.	КС-стимулир. xG2	КС-стимулир. xG2	КС-стимулир. xG2	ID лунки
	500	500	500	9	9	9	9	9	9	9	9	9	Конц-я/развед.
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.	КС-нестимул. xG2	КС-нестимул. xG2	КС-нестимул. xG2	ID лунки
	250	250	250	27	27	27	27	27	27	3	3	3	Конц-я/развед.
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.	КС-нестимул. xG2	КС-нестимул. xG2	КС-нестимул. xG2	ID лунки
	125	125	125	81	81	81	81	81	81	9	9	9	Конц-я/развед.
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.	КС-стимулир. xG3	КС-стимулир. xG3	КС-стимулир. xG3	ID лунки
	62.5	62.5	62.5	3	3	3	3	3	3	3	3	3	Конц-я/развед.
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.	КС-стимулир. xG3	КС-стимулир. xG3	КС-стимулир. xG3	ID лунки
	31.3	31.3	31.3	9	9	9	9	9	9	9	9	9	Конц-я/развед.
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.	КС-нестимул. xG3	КС-нестимул. xG3	КС-нестимул. xG3	ID лунки
	15.6	15.6	15.6	27	27	27	27	27	27	3	3	3	Конц-я/развед.
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.	КС-нестимул. xG3	КС-нестимул. xG3	КС-нестимул. xG3	ID лунки
	0	0	0	81	81	81	81	81	81	9	9	9	Конц-я/развед.
22.6													
22.6													

ФИГ. 23A

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12						Среднее	Среднее
A	2.866	2.882	2.886	2.797	2.164	2.918	0.117	0.116	0.117	0.105	0.108	0.102	450	Gen 2- Стимулир. +TIL 1:3	2890.216	2084.946	3055.126	2676.76267	2757.81
	0.05	0.05	0.05	0.05	0.048	0.051	0.041	0.043	0.041	0.041	0.043	0.041	570	Gen 2- Стимулир. +TIL 1:9	2967.837	2117.45	3072.942	2719.42967	
	2.816	2.832	2.836	2.746	2.117	2.867	0.076	0.074	0.076	0.064	0.065	0.06	Разница	Gen 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]	Gen 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	X кратн. развед.						
B	1.659	1.654	1.65	1.181	0.9	1.215	0.107	0.107	0.108	0.106	0.105	0.102	450	Gen 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	Gen 3- Стимулир. +TIL 1:9	13273.546	>13500.00	13340.37	13306.9575	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	Разница	Gen 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]	Gen 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	X кратн. развед.						
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	Gen 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	Gen 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	Разница	Gen 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]	Gen 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	X кратн. развед.						
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	Gen 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	Gen 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	Разница	Gen 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]	Gen 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	X кратн. развед.						
E	0.334	0.332	0.332	OVRFLW	OVRFLW	OVRFLW	0.114	0.11	0.113	0.103	0.102	0.104	450	Gen 2- Контр. средой стимулир.+TIL 1:3	<0.000	<0.000	<0.000	#DIV/0!	0.00
	0.043	0.042	0.042	0.07	0.068	0.069	0.041	0.041	0.042	0.042	0.042	0.043	570	Gen 2- Контр. средой 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	Разница						
	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	X кратн. развед.						
F	0.222	0.222	0.224	3.84	3.895	3.853	0.114	0.104	0.107	0.101	0.103	0.101	450	Gen 2- Контр. средой стимулир.+TIL 1:3	<0.000	<0.000	<0.000	#DIV/0!	0.00
	0.042	0.043	0.042	0.058	0.056	0.057	0.041	0.041	0.042	0.042	0.041	0.042	570	Gen 2- Контр. средой стимулир.+TIL 1:9	<0.000	<0.000	<0.000	#DIV/0!	
	0.18	0.179	0.181	3.782	3.839	3.796	0.073	0.063	0.066	0.059	0.062	0.059	Разница						
	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	X кратн. развед.						
G	0.174	0.17	0.172	1.996	1.997	2.017	0.114	0.109	0.114	0.106	0.107	0.104	450	Gen 2-Контр. средой 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	Gen 2-Контр. средой нестимулир+TIL 1:9	<0.000	<0.000	<0.000	#DIV/0!	
	0.132	0.128	0.131	1.948	1.949	1.968	0.073	0.067	0.073	0.063	0.065	0.062	Разница						
	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	X кратн. развед.						
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	Gen 3-Контр. средой нестимулир+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	Gen 3-Контр. средой нестимулир+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	Разница						
	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	X кратн. развед.						

ФИГ. 23В

	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.	КС-стимулир. xG2	КС-стимулир. xG2	КС-стимулир. xG2	ID лунки
	1000	1000	1000	3	3	3	3	3	3	3	3	3	Конц-я/развед.
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.	КС-стимулир. xG2	КС-стимулир. xG2	КС-стимулир. xG2	ID лунки
	500	500	500	9	9	9	9	9	9	9	9	9	Конц-я/развед.
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.	КС-нестимул. xG2	КС-нестимул. xG2	КС-нестимул. xG2	ID лунки
	250	250	250	27	27	27	27	27	27	3	3	3	Конц-я/развед.
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.	КС-нестимул. xG2	КС-нестимул. xG2	КС-нестимул. xG2	ID лунки
	125	125	125	81	81	81	81	81	81	9	9	9	Конц-я/развед.
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.	КС-стимулир. xG3	КС-стимулир. xG3	КС-стимулир. xG3	ID лунки
	62.5	62.5	62.5	3	3	3	3	3	3	3	3	3	Конц-я/развед.
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.	КС-стимулир. xG3	КС-стимулир. xG3	КС-стимулир. xG3	ID лунки
	31.3	31.3	31.3	9	9	9	9	9	9	9	9	9	Конц-я/развед.
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.	КС-нестимул. xG3	КС-нестимул. xG3	КС-нестимул. xG3	ID лунки
	15.6	15.6	15.6	27	27	27	27	27	27	3	3	3	Конц-я/развед.
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.	КС-нестимул. xG3	КС-нестимул. xG3	КС-нестимул. xG3	ID лунки
	0	0	0	81	81	81	81	81	81	9	9	9	Конц-я/развед.
22.9													
22.9													

ФИГ. 24A

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12							Среднее	Среднее
A	2.875	2.859	2.877	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	0.053	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	3676.262	3001.429	2926.474	3201.388333	
	2.821	2.807	2.825	3.129	2.768	2.748	0.087	0.085	0.09	0.069	0.069	0.065	Разница	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	3910.387	3552.941	3234.126	3565.818	
				3435.858	2933.14	2905.979	8.766	7.254	11.136	<0.000	<0.000	<0.000	X кратн. развед.						
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	Разница	Gen 3- Стимулир. +TIL 1:27	16231.22	16700.175	14586.268	15839.221	
	503.563	491.203	503.336	408.474	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	
				3676.262	3001.429	2926.474	8.383	4.779	16.076	<0.000	<0.000	<0.000	X кратн. развед.						
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	
	0.929	0.914	0.894	0.531	0.486	0.473	0.074	0.072	0.083	0.07	0.071	0.071	Разница	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	X кратн. развед.						
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	
	0.533	0.509	0.516	0.259	0.243	0.229	0.073	0.067	0.077	0.069	0.07	0.068	Разница	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	171.968	92.74	35.4743333	
				3910.387	3552.941	3234.126	<0.000	<0.000	59.939	<0.000	<0.000	<0.000	X кратн. развед.						
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. средой стимулир. +TIL 1:3	<0.000	<0.000	<0.000	#DIV/0!	0.00
	0.042	0.042	0.042	0.072	0.07	0.072	0.041	0.042	0.042	0.041	0.043	0.041	570	Gen 2-Контр. средой стимулир. +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	Разница						
	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	X кратн. развед.						
F	0.237	0.233	0.239	3.825	3.675	3.745	0.122	0.144	0.125	0.114	0.112	0.111	450	Gen 2-Контр. средой стимулир. +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	0.055	0.042	0.041	0.041	0.042	570	Gen 2-Контр. средой стимулир. +TIL 1:9	<0.000	<0.000	<0.000	0	
	0.195	0.19	0.197	3.768	3.618	3.691	0.081	0.089	0.084	0.073	0.071	0.069	Разница						
	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	X кратн. развед.						
G	0.182	0.173	0.183	1.922	1.987	1.765	0.115	0.115	0.121	0.114	0.111	0.114	450	Gen 2-Контр. средой нестимулир. +TIL 1:3	<0.000	<0.000	<0.000	0	0.00
	0.044	0.041	0.042	0.047	0.048	0.047	0.042	0.041	0.042	0.041	0.041	0.043	570	Gen 2-Контр. средой нестимулир. +TIL 1:9	<0.000	<0.000	<0.000	0	
	0.138	0.132	0.141	1.875	1.939	1.718	0.073	0.073	0.079	0.073	0.07	0.07	Разница						
	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	X кратн. развед.						
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. средой нестимулир. +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. средой нестимулир. +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	Разница						
	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	17638.2	16007.4	77.18	171.968	101.73	1.357	4.779	<0.000	X кратн. развед.						

ФИГ. 24В

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	STD1	STD1	STD1	2A-гранул+TL	2A-гранул+TL	2A-гранул+TL	2A-КС	2A-КС	2A-КС	2A-не стимулир.	2A-не стимулир.	2A-не стимулир.	ID лунки
	1000	1000	1000	3	3	3	3	3	3	3	3	3	Конц-я/развед.
B	STD2	STD2	STD2	2A-гранул+TL	2A-гранул+TL	2A-гранул+TL	2A-КС	2A-КС	2A-КС	2A-не стимулир.	2A-не стимулир.	2A-не стимулир.	ID лунки
	500	500	500	9	9	9	9	9	9	9	9	9	Конц-я/развед.
C	STD3	STD3	STD3	2A-гранул+TL	2A-гранул+TL	2A-гранул+TL	2A-КС	2A-КС	2A-КС	2A-не стимулир.	2A-не стимулир.	2A-не стимулир.	ID лунки
	250	250	250	27	27	27	27	27	27	27	27	27	Конц-я/развед.
D	STD4	STD4	STD4	2A-гранул+TL	2A-гранул+TL	2A-гранул+TL	2A-КС	2A-КС	2A-КС	2A-не стимулир.	2A-не стимулир.	2A-не стимулир.	ID лунки
	125	125	125	81	81	81	81	81	81	81	81	81	Конц-я/развед.
E	STD5	STD5	STD5	2A-гранул+TL	2A-гранул+TL	2A-гранул+TL	2B-не стимулир.	2B-не стимулир.	2B-не стимулир.	2B-КС	2B-КС	2B-КС	ID лунки
	62.5	62.5	62.5	3	3	3	3	3	3	3	3	3	Конц-я/развед.
F	STD6	STD6	STD6	2A-гранул+TL	2A-гранул+TL	2A-гранул+TL	2B-не стимулир.	2B-не стимулир.	2B-не стимулир.	2B-КС	2B-КС	2B-КС	ID лунки
	31.3	31.3	31.3	9	9	9	9	9	9	9	9	9	Конц-я/развед.
G	STD7	STD7	STD7	2A-гранул+TL	2A-гранул+TL	2A-гранул+TL	2B-не стимулир.	2B-не стимулир.	2B-не стимулир.	2B-КС	2B-КС	2B-КС	ID лунки
	15.6	15.6	15.6	27	27	27	27	27	27	27	27	27	Конц-я/развед.
H	STD8	STD8	STD8	2A-гранул+TL	2A-гранул+TL	2A-гранул+TL	2B-не стимулир.	2B-не стимулир.	2B-не стимулир.	2B-КС	2B-КС	2B-КС	ID лунки
	0	0	0	81	81	81	81	81	81	81	81	81	Конц-я/развед.
24.1													
24.1													

ФИГ. 25A

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12							Среднее	Среднее
A	2.119	2.231	2.274	3.051	3.123	3.136	0.079	0.079	0.081	0.18	0.198	0.191	450	2A-гранул+TIL1:3						
	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-гранул+TIL1:9	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	Разница	2A-гранул+TIL1:27	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-гранул+TIL1:81	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	X кратн. развед.	2B-гранул+TIL1:3	?????	?????	?????	#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-гранул+TIL1:9				#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-гранул+TIL1:27	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	Разница	2B-гранул+TIL1:81	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	X кратн. развед.	2A- Нестимулир. +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- Нестимулир. +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- Нестимулир. +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	Разница	2A- Нестимулир. +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	X кратн. развед.	2B- Нестимулир. +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- Нестимулир. +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- Нестимулир. +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	Разница	2B- Нестимулир. +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	X кратн. развед.	2A- Контр. федой 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. федой 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. федой 1:27						
	0.201	0.199	0.199	?????	?????	?????	0.307	0.314	0.232	0.036	0.036	0.036	Разница	2A- Контр. федой 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	X кратн. развед.	2B- Контр. федой 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. федой 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. федой 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	Разница	2B- Контр. федой 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	X кратн. развед.							
G	0.122	0.119	0.117	1.374	1.194	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	1.146	1.396	0.058	0.054	0.046	0.029	0.028	0.027	Разница							
	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	X кратн. развед.							
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	Разница							
	<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	X кратн. развед.							

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-й цикл	Gen 3-D7 1-й цикл	Gen 3-D7 1-й цикл	Gen 3-D7 2-й цикл	Gen 3-D7 2-й цикл	Gen 3-D7 2-й цикл				ID лунки Конц-я/развед.
B	STD2 1000	STD2 1000	STD2 1000	Gen 3-D11 1-й цикл	Gen 3-D11 1-й цикл	Gen 3-D11 1-й цикл	Gen 3-D11 2-й цикл	Gen 3-D11 2-й цикл	Gen 3-D11 2-й цикл				ID лунки Конц-я/развед.
C	STD3 500	STD3 500	STD3 500	Gen 3-D16 1-й цикл	Gen 3-D16 1-й цикл	Gen 3-D16 1-й цикл	Gen 3-D16 2-й цикл	Gen 3-D16 2-й цикл	Gen 3-D16 2-й цикл				ID лунки Конц-я/развед.
D	STD4 250	STD4 250	STD4 250	Gen 2-D11 1-й цикл	Gen 2-D11 1-й цикл	Gen 2-D11 1-й цикл	Gen 2-D11 2-й цикл	Gen 2-D11 2-й цикл	Gen 2-D11 2-й цикл				ID лунки Конц-я/развед.
E	STD5 125	STD5 125	STD5 125	Gen 2-D16 1-й цикл	Gen 2-D16 1-й цикл	Gen 2-D16 1-й цикл	Gen 2-D16 2-й цикл	Gen 2-D16 2-й цикл	Gen 2-D16 2-й цикл				ID лунки Конц-я/развед.
F	STD6 62.5	STD6 62.5	STD6 62.5	Gen 2-D22 1-й цикл	Gen 2-D22 1-й цикл	Gen 2-D22 1-й цикл	Gen 2-D22 2-й цикл	Gen 2-D22 2-й цикл	Gen 2-D22 2-й цикл				ID лунки Конц-я/развед.
G	STD7 31.3	STD7 31.3	STD7 31.3	Пустая	Пустая	Пустая	Пустая	Пустая	Пустая				ID лунки
H	STD8 0	STD8 0	STD8 0	Пустая	Пустая	Пустая	Пустая	Пустая	Пустая				Конц-я/развед.
22													
22													

ФИГ. 26A

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12										
A	2.223	2.297	2.239	0.218	0.22	0.215	0.187	0.187	0.184				450	Кратн. разведения = 100								
	0.052	0.052	0.051	0.043	0.042	0.043	0.044	0.043	0.051				570									
	2.171	2.246	2.188	0.175	0.177	0.172	0.143	0.145	0.133				Разница		Значение A	Значение B	Значение C	Значение A*100	Значение B*100	Значение C*100	Среднее	
	1970.541	2046.905	1987.758	124.53	126.082	121.662	99.302	100.904	92.083				[концентрация]	Gen 3 Инициация REP 1-й цикл	124.530	126.082	121.662	12453.0	12608.2	12166.2	12409.1	
B	1.095	1.281	1.276	0.415	0.412	0.435	0.394	0.392	0.356				450	Gen 3 Масштабиро-е 1-й цикл	282.400	280.328	299.854	28240.0	28032.8	29985.4	28752.7	
	0.047	0.046	0.047	0.043	0.043	0.043	0.043	0.044	0.044				570	Gen 3 Обор 1-й цикл	252.774	247.768	250.557	25277.4	24776.8	25055.7	25036.6	
	1.048	1.234	1.229	0.372	0.369	0.393	0.351	0.348	0.312				Разница									
	877.734	1051.728	1047.027	282.4	280.328	299.854	264.954	262.893	233.453				[концентрация]	Gen 2 Инициация REP 1-й цикл	79.199	77.702	93.523	7919.9	7770.2	9352.3	8347.5	
C	0.683	0.683	0.68	0.379	0.372	0.376	0.356	0.338	0.33				450	Gen 2 Масштабиро-е 1-й цикл	136.754	131.526	131.682	13675.4	13152.6	13168.2	13332.1	
	0.045	0.044	0.044	0.043	0.043	0.043	0.043	0.043	0.043				570	Gen 2 Обор 1-й цикл	117.564	130.125	121.895	11756.4	13012.5	12189.5	12319.5	
	0.638	0.639	0.637	0.336	0.33	0.333	0.313	0.295	0.287				Разница									
	510.008	510.619	508.261	252.774	247.768	250.557	233.9443	219.211	212.888				[концентрация]									
D	0.37	0.38	0.382	0.162	0.156	0.177	0.155	0.15	0.149				450	Gen 3 Инициация REP 2-й цикл	99.302	100.904	92.083	9930.2	10090.4	9208.3	9743.0	
	0.043	0.045	0.043	0.046	0.042	0.042	0.043	0.044	0.043				570	Gen 3 Масштабиро-е 2-й цикл	264.954	262.893	233.453	26495.4	26289.3	23345.3	25376.7	
	0.328	0.335	0.338	0.116	0.114	0.135	0.112	0.106	0.106				Разница	Gen 3 Обор 2-й цикл	233.943	219.211	212.888	23394.3	21921.1	21288.8	22201.4	
	246.046	252.035	254.91	79.199	77.702	93.523	76.431	71.588	71.737				[концентрация]									
E	0.216	0.219	0.22	0.235	0.227	0.228	0.253	0.231	0.222				450	Gen 2 Инициация REP 2-й цикл	76.431	71.588	71.737	7643.1	7158.8	7173.7	7325.2	
	0.043	0.043	0.045	0.044	0.043	0.043	0.048	0.045	0.045				570	Gen 2 Масштабиро-е 2-й цикл	147.807	132.695	125.539	14780.7	13269.5	12553.9	13534.7	
	0.173	0.176	0.175	0.191	0.185	0.185	0.205	0.186	0.177				Разница	Gen 2 Обор 2-й цикл	139.491	135.738	149.459	13949.1	13573.8	14945.9	14156.3	
	122.514	124.995	123.909	136.754	131.526	131.682	147.807	132.695	125.539				[концентрация]									
F	0.137	0.132	0.133	0.21	0.227	0.216	0.238	0.233	0.253				450									
	0.047	0.043	0.044	0.043	0.044	0.044	0.043	0.043	0.045				570									
	0.089	0.089	0.089	0.166	0.183	0.172	0.195	0.19	0.207				Разница									
	59.482	58.969	59.116	117.564	130.125	121.895	139.491	135.738	149.459				[концентрация]									
G	0.088	0.088	0.089	2.265	2.329	2.22	2.225	2.175	2.239				450									
	0.042	0.043	0.043	0.05	0.05	0.049	0.051	0.052	0.053				570									
	0.046	0.046	0.046	2.215	2.28	2.171	2.174	2.122	2.186				Разница									
	28.375	28.237	28.514	2014.9	2081.651	1970.439	1973.799	1920.845	1986.127				[концентрация]									
H	0.05	0.048	0.048	2.272	2.267	2.213	2.244	2.254	2.248				450									
	0.043	0.042	0.041	0.05	0.05	0.052	0.057	0.052	0.059				570									
	0.007	0.006	0.007	2.223	2.217	2.161	2.187	2.202	2.188				Разница									
	3.1	2.399	2.573	2023.073	2016.943	1960.16	1986.84	2002.036	1988.165				[концентрация]									

ФИГ. 26B

№ образца	Описание	Глюкоза (г/л)	Лактат (г/л)	Аммиак (ммоль/л)	Глутамин (ммоль/л)	Glutamax (ммоль/л)	Glutamax-глутамин (ммоль/л)
1	Gen 2-Инициация REP Первый цикл №L4054	1.78	0.14	2.16	1.56	1.71	0.16
2	Gen 2-Масштабирование Первый цикл №L4054	1.36	0.89	1.40	1.76	1.90	0.15
3	Gen 2-Сбор Первый цикл №L4054	0.83	1.68	2.46	1.69	1.85	0.17
4	Gen 3-Инициация REP Первый цикл №L4054	1.68	0.29	1.76	2.11	2.29	0.18
5	Gen 3-Масштабирование Первый цикл №L4054	1.28	0.94	1.64	1.70	1.87	0.16
6	Gen 3-Сбор Первый цикл №L4054	1.07	1.53	2.23	1.39	1.54	0.14
7	Gen 2-Инициация REP Второй цикл №L4055	1.91	0.08	2.29	1.60	1.74	0.14
8	Gen 2-Масштабирование Второй цикл №L4055	1.61	0.77	1.40	1.78	1.93	0.15
9	Gen 2-Сбор Второй цикл №L4055	0.85	1.86	2.46	1.39	1.55	0.16
10	Gen 3-Инициация REP Второй цикл №L4055	1.77	0.18	1.74	2.06	2.23	0.17
11	Gen 3-Масштабирование Второй цикл №L4055	1.60	0.72	1.54	1.68	1.84	0.15
12	Gen 3-Сбор Второй цикл №L4055	1.44	1.32	2.07	1.79	1.95	0.16

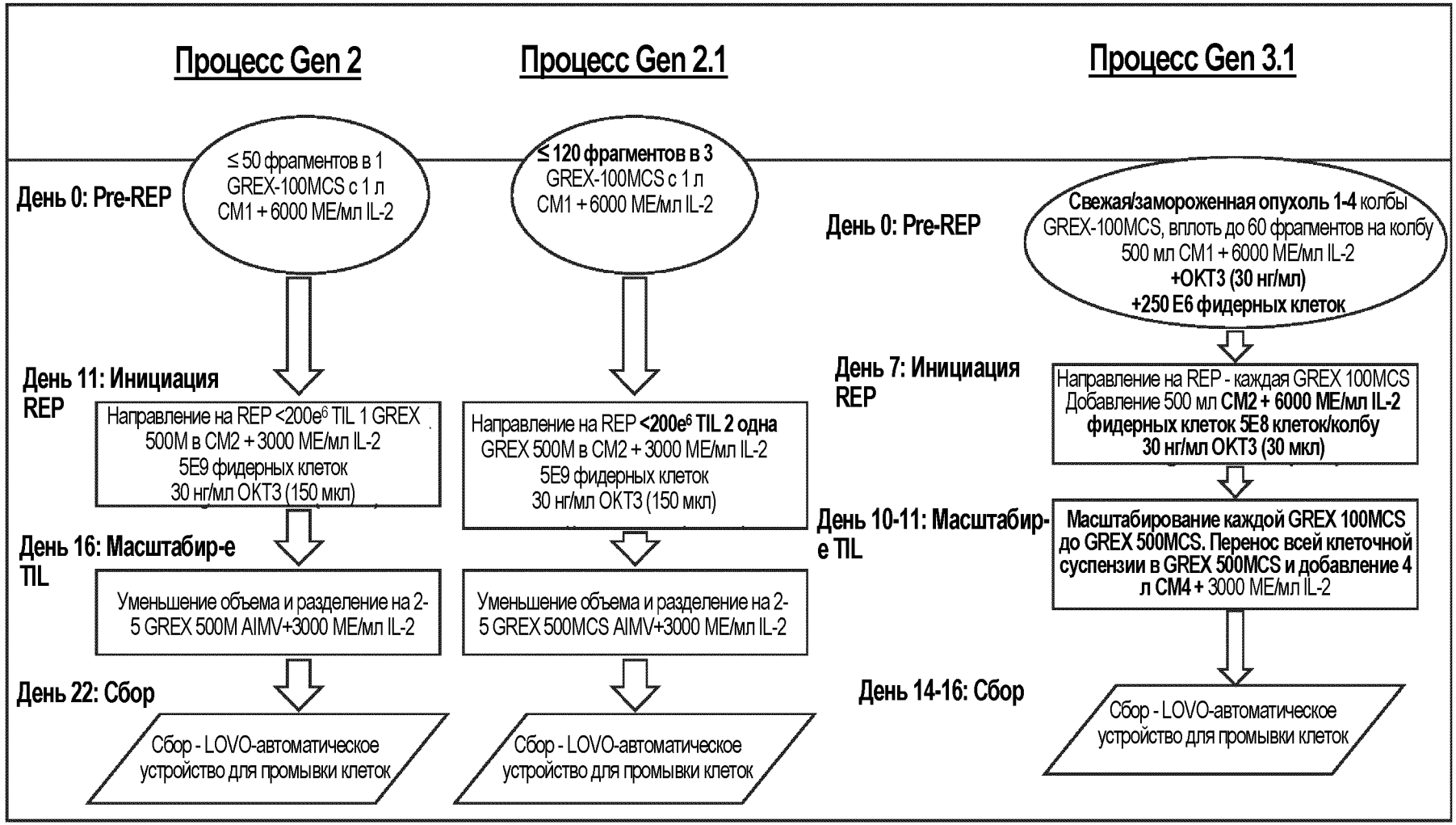
ФИГ. 27

	$FIL	S/L/1301 |Средн. геом..	S/L/Pt | Средн. геометрич. (FL03-A)
A1 gen2L4054 ne	A1 gen2L4054 neg.fcs	34.5	3.24
A2 gen2L4054 ne	A2 gen2L4054 neg.fcs	34	3.19
A3 gen2L4054 po	A3 gen2L4054 pos.fcs	1834	70.6
A4 gen2L4054 po	A4 gen2L4054 pos.fcs	1872	70.3
A5 gen2L4055 ne	A5 gen2L4055 neg.fcs	31.9	4.23
A6 gen2L4055 ne	A6 gen2L4055 neg.fcs	32.4	4.87
A7 gen2L4055 po	A7 gen2L4055 pos.fcs	1941	88.7
A8 gen2L4055 po	A8 gen2L4055 pos.fcs	1933	91.1
B1 gen3L4054 ne	B1 gen3L4054 neg.fcs	31.2	3.45
B2 gen3L4054 ne	B2 gen3L4054 neg.fcs	31.9	3.39
B3 gen3L4054 po	B3 gen3L4054 pos.fcs	2016	61.3
B4 gen3L4054 po	B4 gen3L4054 pos.fcs	2014	76.2
B5 gen3L4055 ne	B5 gen3L4055 neg.fcs	33.7	6.76
B6 gen3L4055 ne	B6 gen3L4055 neg.fcs	35.4	6.7
B7 gen3L4055 po	B7 gen3L4055 pos.fcs	2158	99.4
B8 gen3L4055 po	B8 gen3L4055 pos.fcs	1938	99.5
Среднее	-	998	43.3
СКО	-	999	41.3

ФИГ. 28

Исследование	Образец	ID образца	Вид	Цепь	Чтений	CDR3	Уникальн. 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: Pre-REP
≤ 50 фрагментов в 1 GREX-100MCS с 1 л CM1 + 6000 МЕ/мл IL-2
≤ 120 фрагментов в 3 GREX-100MCS с 1 л CM1 + 6000 МЕ/мл IL-2
День 0: Pre-REP
Свежая/замороженная опухоль 1-4 колбы GREX-100MCS, вплоть до 60 фрагментов на колбу
500 мл CM1 + 6000 МЕ/мл IL-2
+OKT3 (30 нг/мл)
+250 E6 фидерных клеток
День 11: Инициация REP
Направление на REP <200e6 TIL 1 GREX 500M в CM2 + 3000 МЕ/мл IL-2
5E9 фидерных клеток
30 нг/мл OKT3 (150 мкл)
Направление на REP <200e6 TIL 2 одна GREX 500M в CM2 + 3000 МЕ/мл IL-2
5E9 фидерных клеток
30 нг/мл OKT3 (150 мкл)
День 7: Инициация REP
Направление на REP - каждая GREX 100MCS
Добавление 500 мл CM2 + 6000 МЕ/мл IL-2
фидерных клеток 5E8 клеток/колбу
30 нг/мл OKT3 (30 мкл)
День 16: Масштабир-е TIL
Уменьшение объема и разделение на 2-5 GREX 500M AIMV+3000 МЕ/мл IL-2
Уменьшение объема и разделение на 2-5 GREX 500MCS AIMV+3000 МЕ/мл IL-2
День 10-11: Масштабир-е TIL
Масштабирование каждой GREX 100MCS до GREX 500MCS. Перенос всей клеточной суспензии в GREX 500MCS и добавление 4 л CM4 + 3000 МЕ/мл IL-2
День 22: Сбор
Сбор - LOVO-автоматическое устройство для промывки клеток
Сбор - LOVO-автоматическое устройство для промывки клеток
День 14-16: Сбор
Сбор - LOVO-автоматическое устройство для промывки клеток

ФИГ. 30

ЭТАП	Gen 2	Gen 2.1	Gen 3.0 оптимизированный
Pre REP – день 0	≤ 50 фрагментов/ 1-G-Rex 100MCS - **11 дней**	≤ 180 фрагментов/ 3-G-Rex Предварительно приготовленная подогретая среда CM1 100MCS - **11 дней**	***Свежая или замороженная опухоль*** Цельная опухоль с ≤ 30 фрагментами, до 60 фрагментов на 1 G-Rex 100MCS (до 4 G-Rex), предварительно приготовленная подогретая среда **– 7 дней. Pre REP, фидеры 2,5 E8 клеток + OKT-3 (30 нг/мл)**
Инициация REP	Направление на REP - День 11- **<200 E6 TIL** 1 G-Rex 500MCS	Направление на REP - День 11- **<200 E6 TIL** Предварительно приготовленная подогретая среда CM2 в одной G-Rex 500MCS	Направление на REP – День **7 – все TIL-клетки – те же G-Rex 100MCS (100MCS до 4 GREX), стандартная среда или среда с определенным составом (бессывороточная). Добавление фидеров 5 E8 клеток + OKT-3 (30 нг/мл)**
Наращивание TIL или масштабирование	1-5 G-Rex 500MCS **Разделение, день 16**	2-5 G-Rex 500MCS Предварительно приготовленная подогретая среда CM4 **Разделение, день 16**	Из G-REX 100MCS переносят суспензию TIL в G-REX 500MCS, вплоть до 4 GREX 500MCS – стандартная среда или среда с определенным составом (бессывороточная) **Масштабирование в день 10 или 11**
Сбор	**Сбор, день 22,** LOVO-автоматическое устройство для промывки клеток	**Сбор, день 22,** LOVO-автоматическое устройство для промывки клеток (5 циклов промывки)	**Сбор, день 14 или 16** LOVO-автоматическое устройство для промывки клеток (5 циклов промывки)
Готовый препарат	Криоконсервированный продукт 300 МЕ/мл IL2 - CS10 в жидком N_2, несколько аликвот	Криоконсервированный продукт 300 МЕ/мл IL2 - CS10 в жидком N_2, несколько аликвот	Криоконсервированный продукт 300 МЕ/мл IL2 - CS10 в жидком N_2, несколько аликвот
Продолжительность процесса	**22 дня**	**22 дня**	**16 дней**

ФИГ. 31

День процесса	**Условия**	**Gen 3.1**
День 0 – инициация pre REP	**Среда CM1**	**500 мл**
	IL-2 (6000 МЕ/мл)	+
	OKT-3 (30 нг/мл)	+
	Фидеры (250 E+06)	+

День процесса	**Условия**	**Gen 3.1**
День 7 – инициация REP	**Среда CM2**	**500 мл**
	IL-2 (6000 МЕ/мл)	+
	OKT-3 (30 нг/мл), добавляемое в день 7	+
	Фидеры, добавляемые в день 7	**500 E06**
	Всего фидеров к этому дню	**750 E+06**

День процесса	**Условия**	**Gen 3.1**
День 9-11 – масштабирование	Из G-REX 100MCS переносят суспензию TIL в 1 G-REX 500MCS (до 3 GREX 500MCS)	**Да**
День 16 – сбор	LOVO-автоматическое устройство для промывки клеток	**Да**

ФИГ. 32

Сравнение процессов	Ключевые изменения процесса	Достигаемые преимущества
Gen 2 с Gen 2.1	• Начинают процесс с двумя колбами вместо одной колбы • Разделяют фидерный слой в инициации REP между 2 колбами G-Rex500MCS • Предварительно готовят среду и подогревают перед применением	• Потенциальное удвоение конечного количества клеток (дозы) с увеличенным репертуаром TIL. • Процесс на всем его протяжении осуществляется с запасом
Gen 2.1 с Gen 3.1	• Свежая или замороженная опухоль • 14-16-дневный процесс (в сравнении с 22-дневным) • Уменьшение общего количества фидерных слоев в ходе процесса • Фидерный слой и OKT3 присутствуют в день 0 • REP инициируют с фрагментами • Масштабирование 100MCS до 500MCS • Масштабирование до нескольких колб pre-REP • Стандартная среда и среда с определенным составом (бессывороточная)	• Повышенная эффективность • Улучшенный фенотип • Уменьшенная продолжительность процесса • Меньшее тестирование реагентов • Сниженная вариабельность процесса • Реагенты с определенным составом • Увеличенный репертуар • Снижение содержания примесей (фидера) • Сопоставимая или более высокая доза.

ФИГ. 33

Сравнение процессов	Ключевые изменения процесса	Желаемое улучшение	Критерии успеха	Результат
Gen 2 с Gen 3.0	• 14-16 дней • Инициация REP с фрагментами в не более чем 4 колбах. • 100MCS масштабируется до 500MCS	• Повышенная эффективность • Улучшенный фенотип • Сниженная продолжительность процесса	• Повышенная эффективность согласно результатам измерения IFN-γ ✓ • Сопоставимый фенотип ✓ • Сопоставимая доза ✓ • Сопоставимая чистота ✓ (фидерных клеток) • Сохранение клонального разнообразия ✓	• Повышенная эффективность по сравнению с Gen2 • Улучшенная экспрессия CD28 на CD8 клетках • Максимальная вместимость колбы достигнута на день 16 Gen 3.1 • Снижение использования фидерных клеток • Повышенное разнообразие

ФИГ. 34

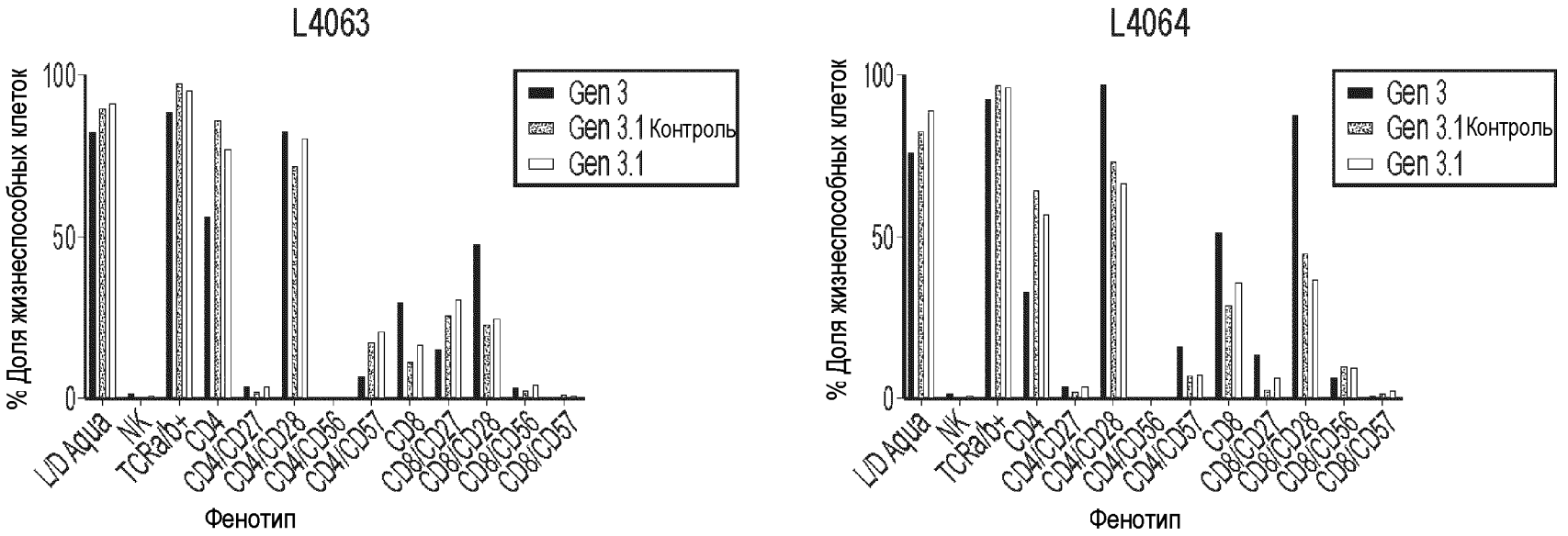
Процесс	Gen 2	Gen 3
L4054	Стандартная среда	Стандартная среда
L4055	Стандартная среда	Стандартная среда
M1085T	Стандартная среда	Стандартная среда

Процесс	Gen 3	Gen 3.1 контроль	Gen 3.1
L4063	Стандартная среда	Стандартная среда	Стандартная среда
L4064	Среда с определенным составом	Среда с определенным составом	Среда с определенным составом

Стандартная среда:
Pre REP: CM1
Инициация REP: CM2
Разделение или масштабирование: CM4

Среда с определенным составом:
CTS Optimizer (бессывороточная среда) в каждый день процесса

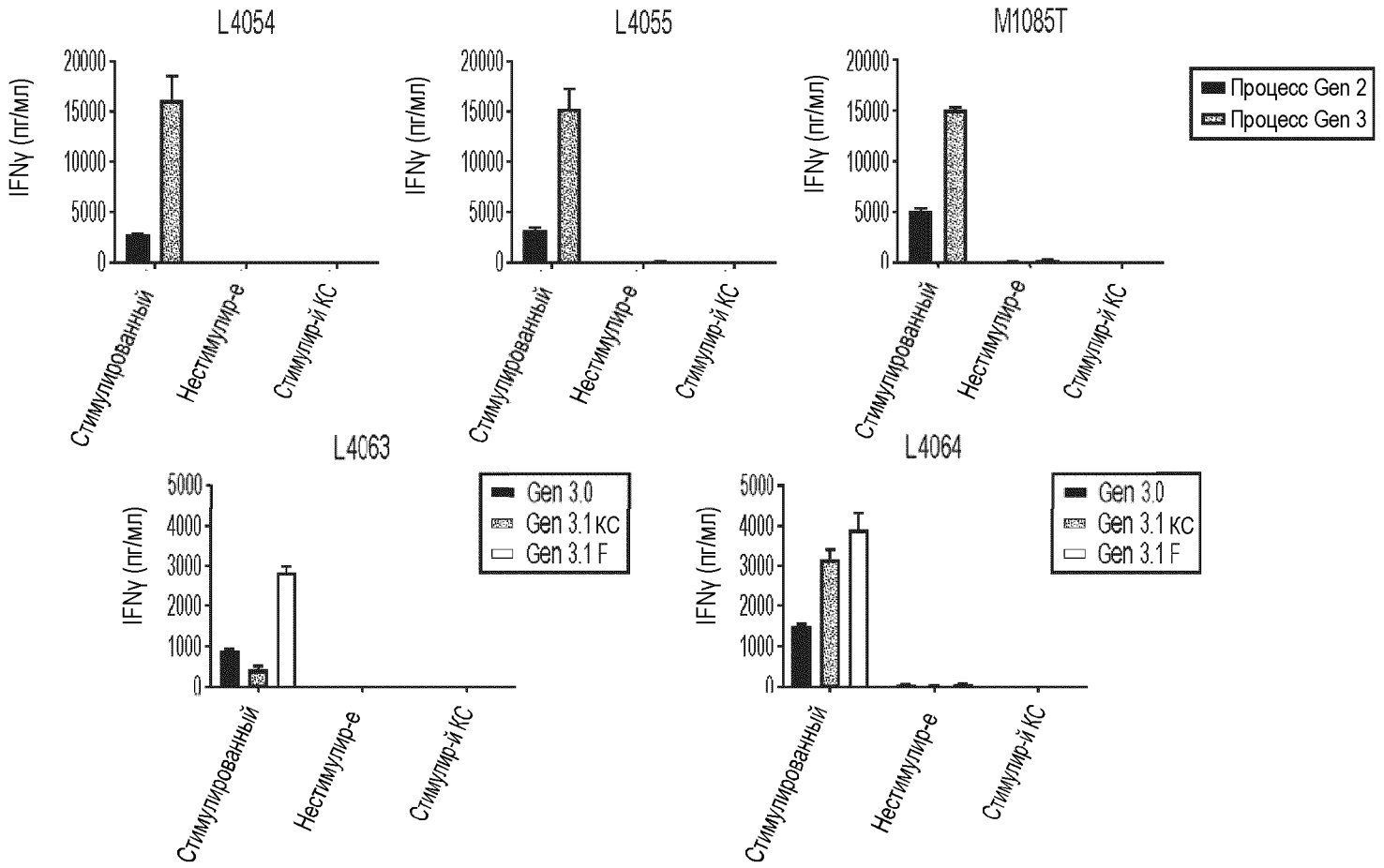
ФИГ. 35



Идентификационный № опухоли	**L4063 Стандартная среда**			**L4064 Среда с определенным составом**		
Процесс	**Gen 3.0**	**Gen 3.1 Контроль**	**Gen 3.1**	**Gen 3.0**	**Gen 3.1 Контроль**	**Gen 3.1**
Кол-во фрагментов	53	53	53	21	21	21

Идентиф-й № 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 TVC на фрагмент	1,37E+08	3,19E+08	3,53E+08	5,90E+08	7,57E+08	9,29E+08
% жизнеспособности 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 ***

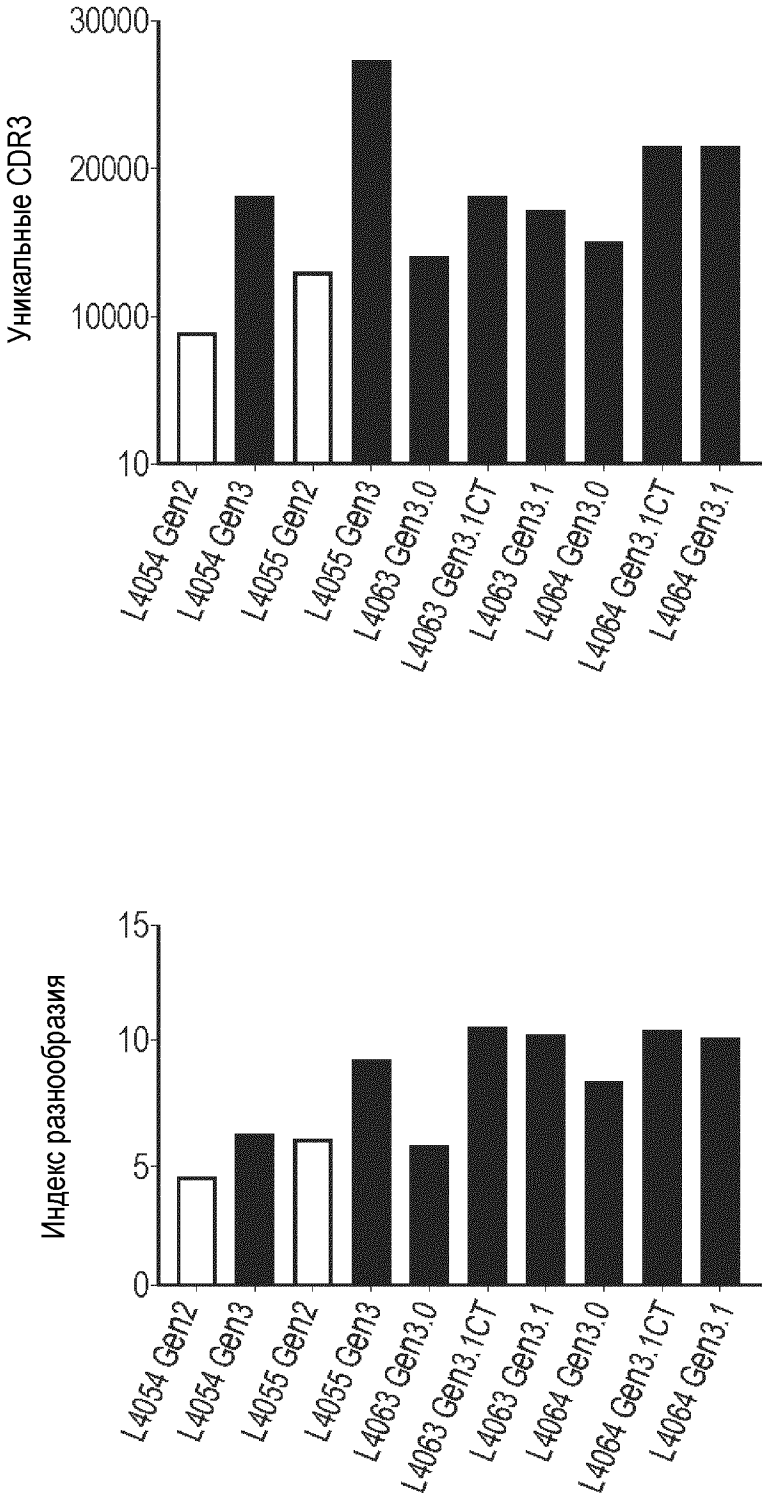
ФИГ. 36



L4063 – Стандартная среда: **L4064 – Среда с определенным составом**

День процесса	Условия	Gen 3.0	Gen 3.1 КС (контроль)	Gen 3.1 F
День 0 – инициация pre REP	Среда CM1	500 мл	500 мл	500 мл
	IL-2 (6000 МЕ/мл)	+	+	+
	OKT-3 (30 нг/мл)	-	+	+
	Фидеры (250 E+06)	-	-	+

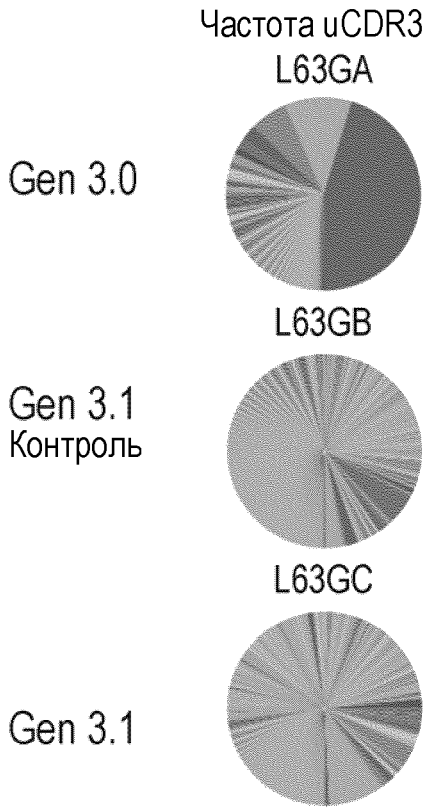
ФИГ. 37


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
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

ФИГ. 38

Условия в день 0	Gen 3.0	Gen 3.1 (контроль)	Gen 3.1
Среда	500 мл	500 мл	500 мл
IL-2 (6E+06)	+	+	+
OKT-3 (30 нг/мл)	-	+	+
Фидеры (250 E+06)	-	-	+

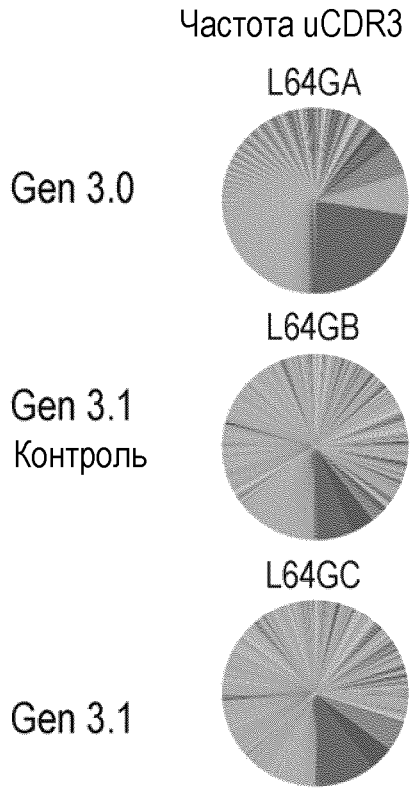
Количество uCDR3 (% перекрытия)	Все uCDR3			Лучшие 80% uCDR3		
	Gen 3.0	Gen 3.1 контроль	Gen 3.1	Gen 3.0	Gen 3.1 контроль	Gen 3.1
Gen 3.0	14005	3240 (23)	2959 (21)	1105	1000 (90)	975 (88)
Gen 3.1 контроль	-	18149	-	-	2438	-
Gen 3.1	-	-	17181	-	-	2332



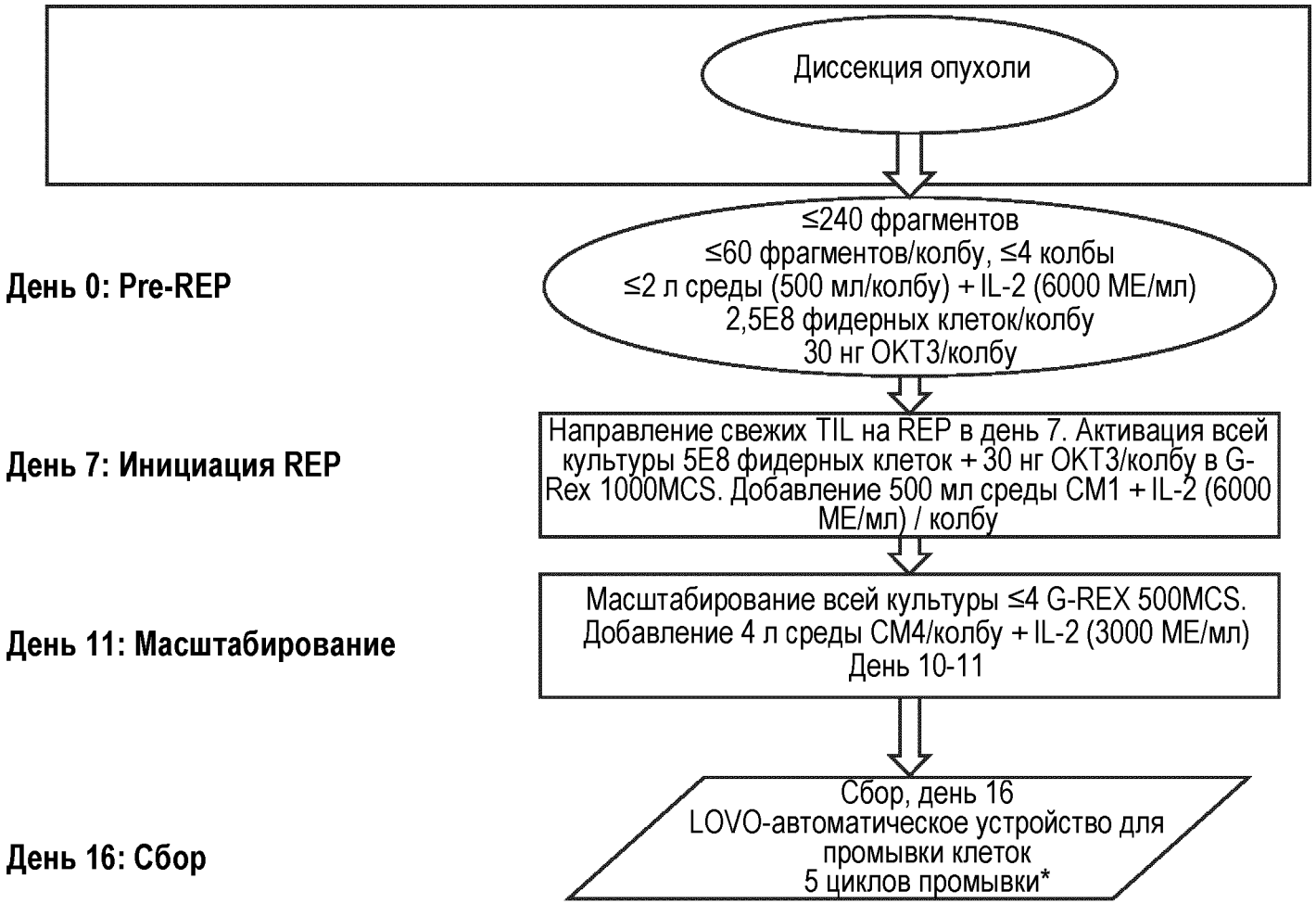
ФИГ. 39

Условия в день 0	**Gen 3.0**	**Gen 3.1 (контроль)**	**Gen 3.1**
Среда CM1	500 мл	500 мл	500 мл
IL-2 (6E+06)	+	+	+
OKT-3 (30 нг/мл)	-	+	+
Фидеры (250 E+06)	-	-	+

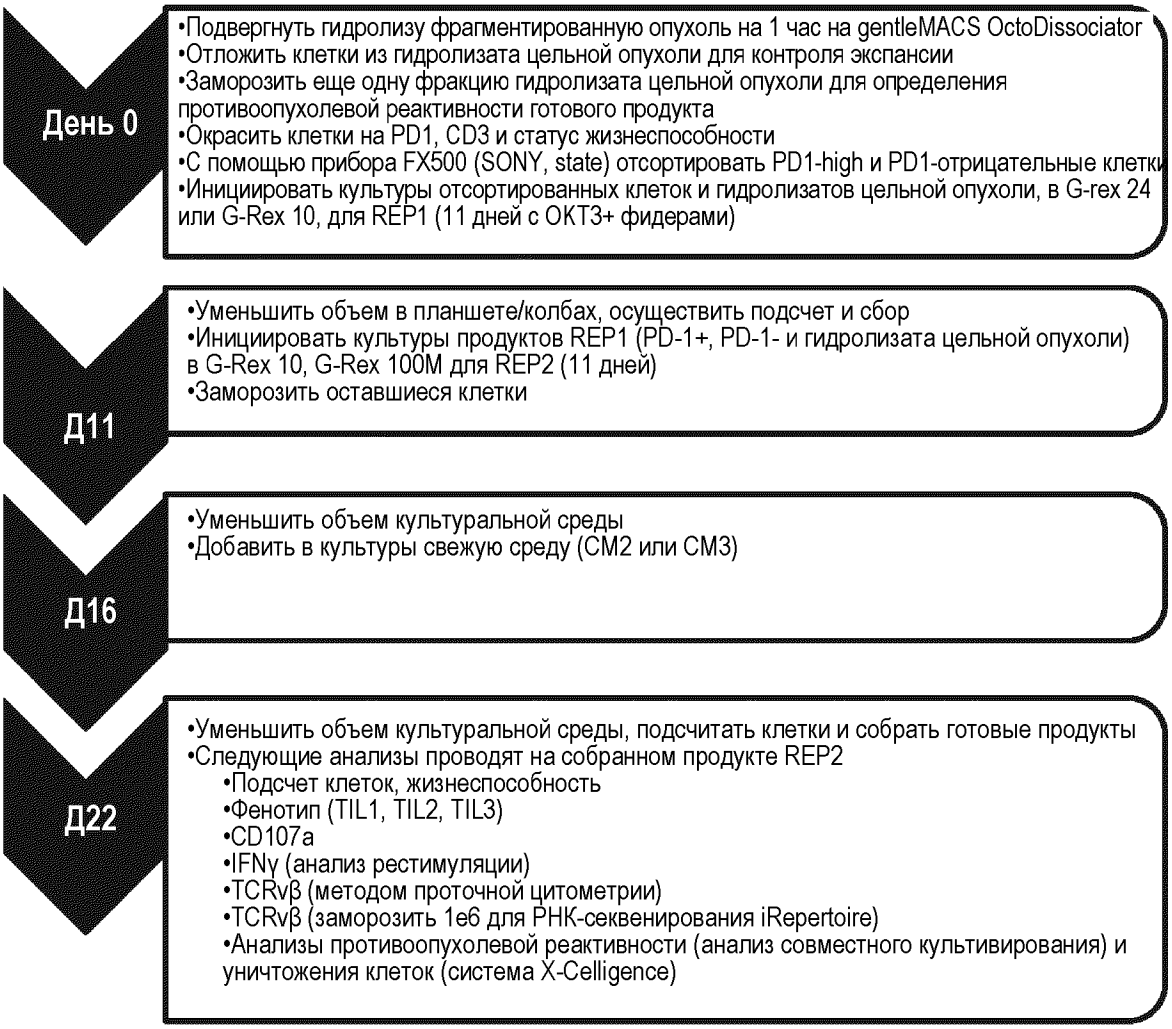
Количество uCDR3 (% перекрытия)	**Все uCDR3**			**Лучшие 80% uCDR3**		
	Gen 3.0	**Gen 3.1 контроль**	**Gen 3.1**	**Gen 3.0**	**Gen 3.1 контроль**	**Gen 3.1**
Gen 3.0	15107	5486 **(36)**	5541 **(37)**	2479	2186 **(88)**	2163 **(87)**
Gen 3.1 контроль	-	21460	-	-	3247	-
Gen 3.1	-	-	21503	-	-	3264



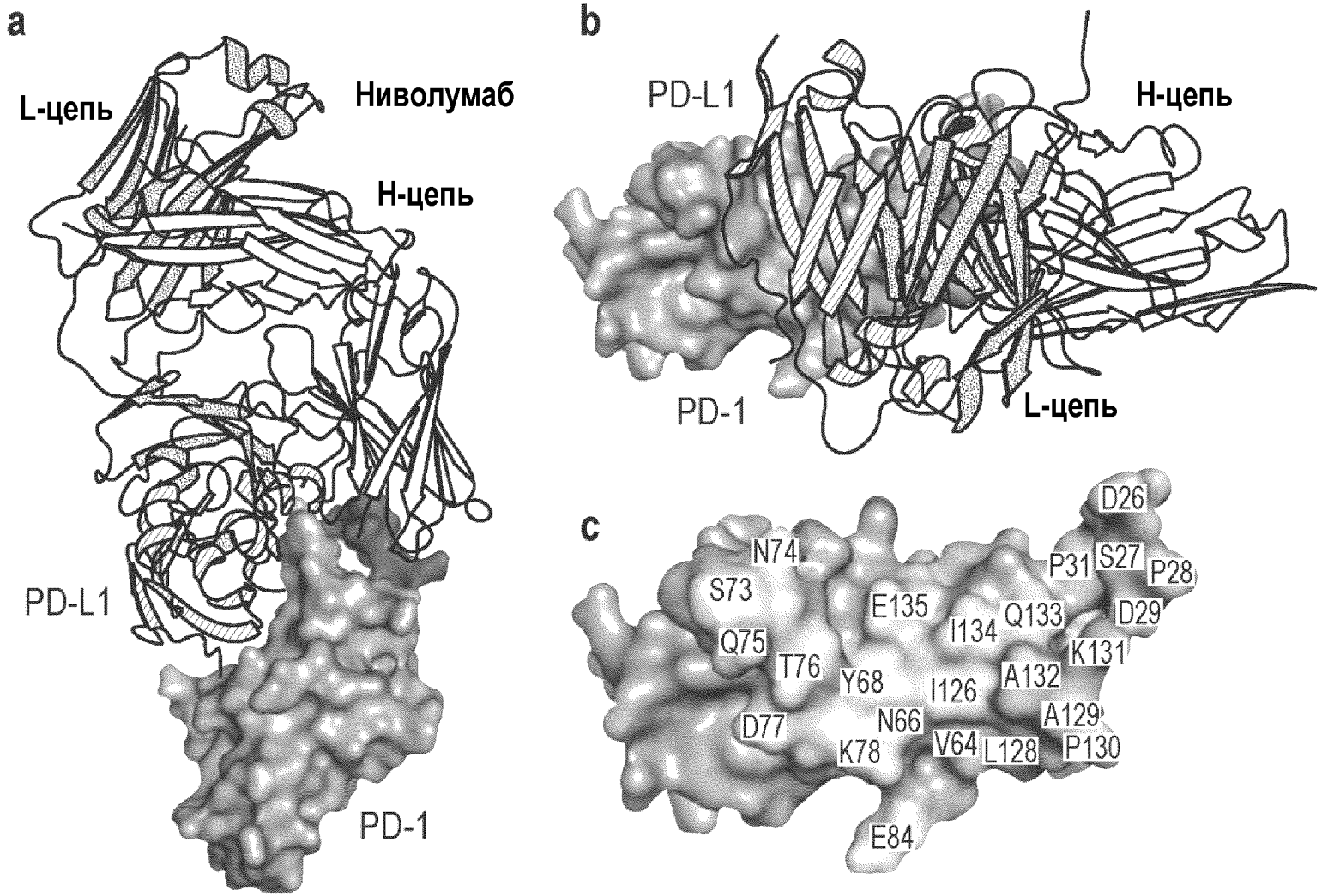
ФИГ. 40


Диссекция опухоли
День 0: Pre-REP
≤240 фрагментов
≤60 фрагментов/колбу, ≤4 колбы
≤2 л среды (500 мл/колбу) + IL-2 (6000 МЕ/мл)
2,5E8 фидерных клеток/колбу
30 нг OKT3/колбу
День 7: Инициация REP
Направление свежих TIL на REP в день 7. Активация всей культуры 5E8 фидерных клеток + 30 нг OKT3/колбу в G-Rex 1000MCS. Добавление 500 мл среды CM1 + IL-2 (6000 МЕ/мл) / колбу
День 11: Масштабирование
Масштабирование всей культуры ≤4 G-REX 500MCS. Добавление 4 л среды CM4/колбу + IL-2 (3000 МЕ/мл) День 10-11
День 16: Сбор
Сбор, день 16
LOVO-автоматическое устройство для промывки клеток
5 циклов промывки*

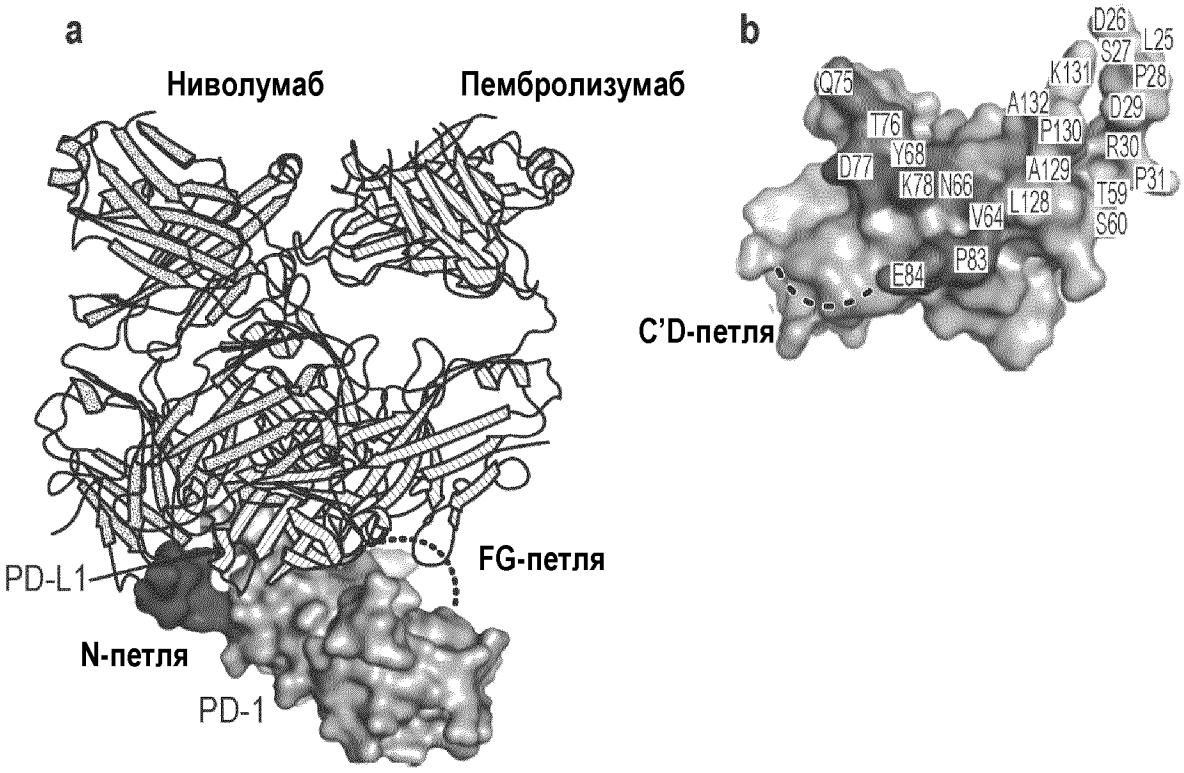
ФИГ. 41


День 0
•Подвергнуть гидролизу фрагментированную опухоль на 1 час на gentleMACS OctoDissociator
•Отложить клетки из гидролизата цельной опухоли для контроля экспансии
•Заморозить еще одну фракцию гидролизата цельной опухоли для определения противоопухолевой реактивности готового продукта
•Окрасить клетки на PD1, CD3 и статус жизнеспособности
•С помощью прибора FX500 (SONY, state) отсортировать PD1-high и PD1-отрицательные клетки
•Инициировать культуры отсортированных клеток и гидролизатов цельной опухоли, в G-rex 24 или G-Rex 10, для REP1 (11 дней с OKT3+ фидерами)
Д11
•Уменьшить объем в планшете/колбах, осуществить подсчет и сбор
•Инициировать культуры продуктов REP1 (PD-1+, PD-1- и гидролизата цельной опухоли) в G-Rex 10, G-Rex 100M для REP2 (11 дней)
•Заморозить оставшиеся клетки
Д16
•Уменьшить объем культуральной среды
•Добавить в культуры свежую среду (CM2 или CM3)
Д22
•Уменьшить объем культуральной среды, подсчитать клетки и собрать готовые продукты
•Следующие анализы проводят на собранном продукте REP2
•Подсчет клеток, жизнеспособность
•Фенотип (TIL1, TIL2, TIL3)
•CD107a
•IFNγ (анализ рестимуляции)
•TCRvβ (методом проточной цитометрии)
•TCRvβ (заморозить 1e6 для РНК-секвенирования iRepertoire)
•Анализы противоопухолевой реактивности (анализ совместного культивирования) и уничтожения клеток (система X-Celligence)

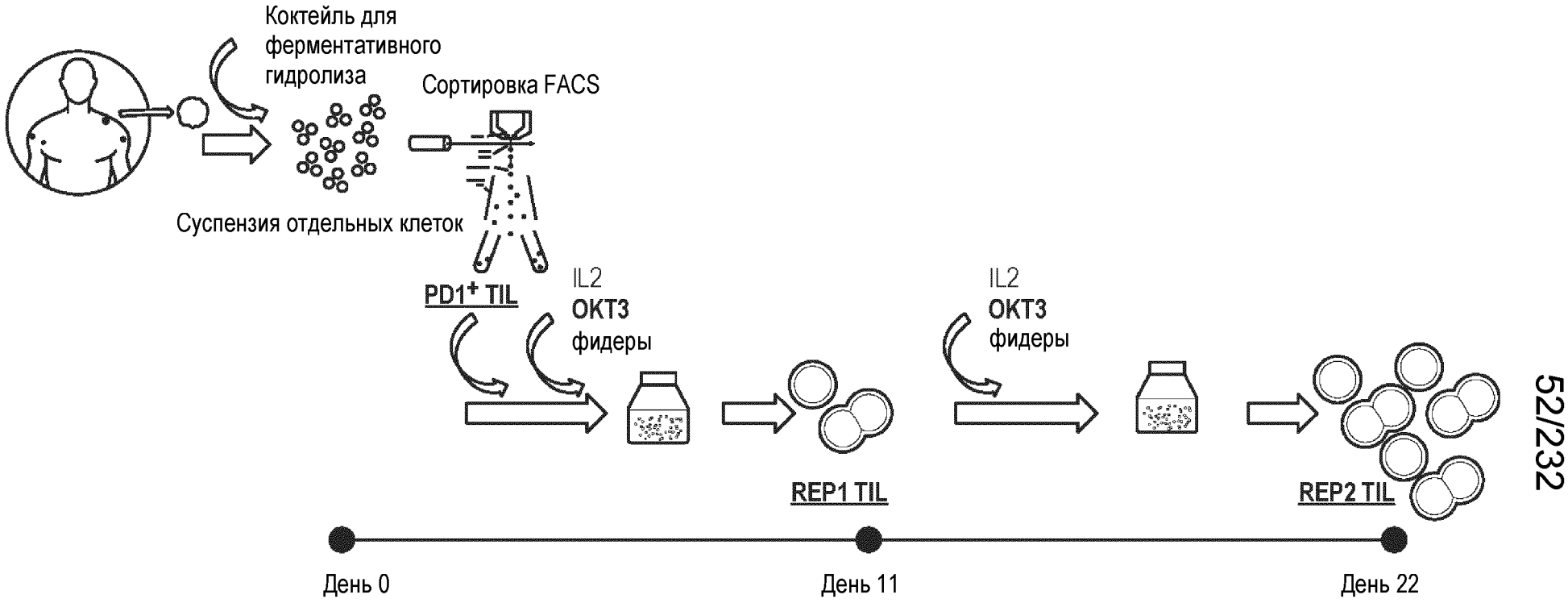
ФИГ. 42


a
L-цепь
Ниволумаб
H-цепь
PD-L1
PD-1
b
PD-L1
H-цепь
PD-1
L-цепь
c
D26
N74
P31
S27
P28
S73
E135
Q133
D29
I134
Q75
K131
T76
Y68
A132
I126
A129
D77
N66
V64
L128
P130
K78
E84

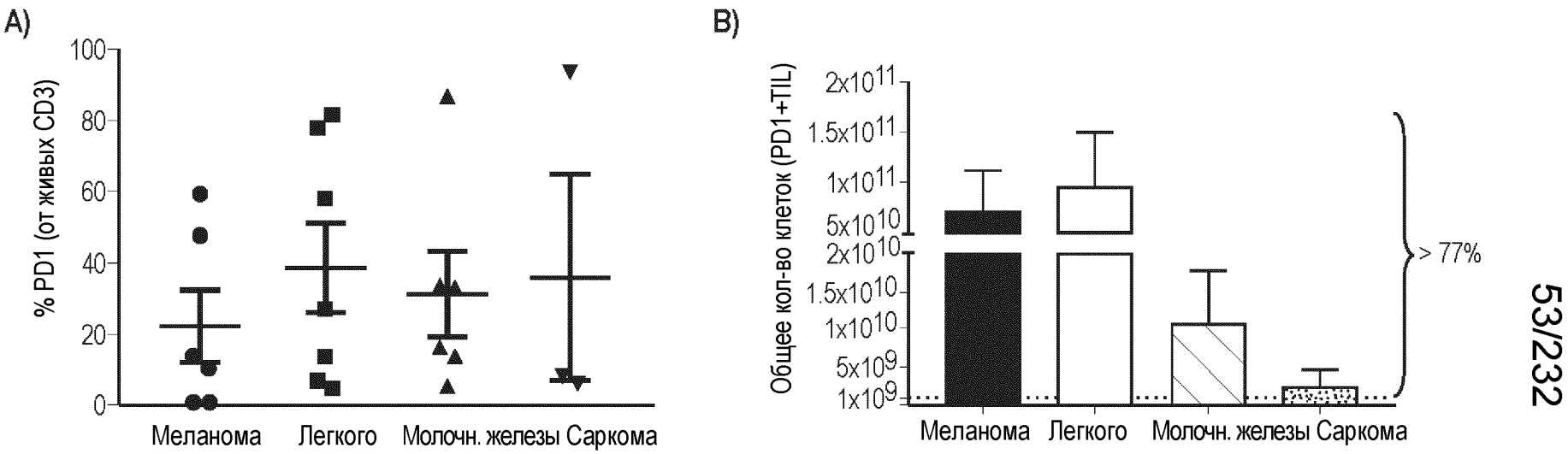
ФИГ. 43


a
Ниволумаб
Пембролизумаб
PD-L1
FG-петля
N-петля
PD-1
b
D26
L25
S27
K131
P28
Q75
A132
D29
T76
P130
R30
Y68
D77
A129
P31
K78
N66
T59
L128
V64
S60
P83
E84
C'D-петля

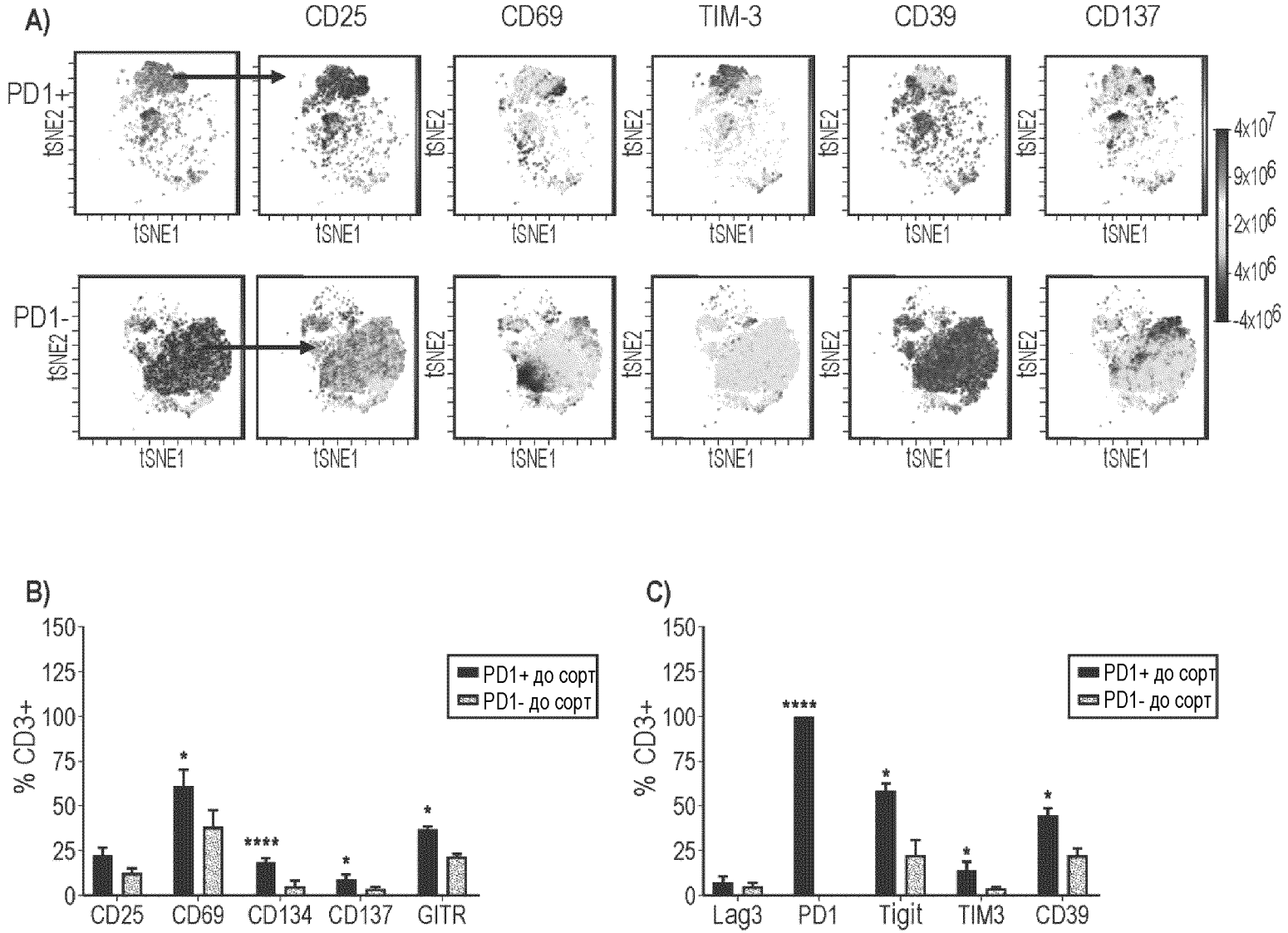
ФИГ. 44


Коктейль для ферментативного гидролиза
Сортировка FACS
Суспензия отдельных клеток
PD1+ TIL
IL2
OKT3
фидеры
REP1 TIL
IL2
OKT3
фидеры
REP2 TIL
День 0
День 11
День 22

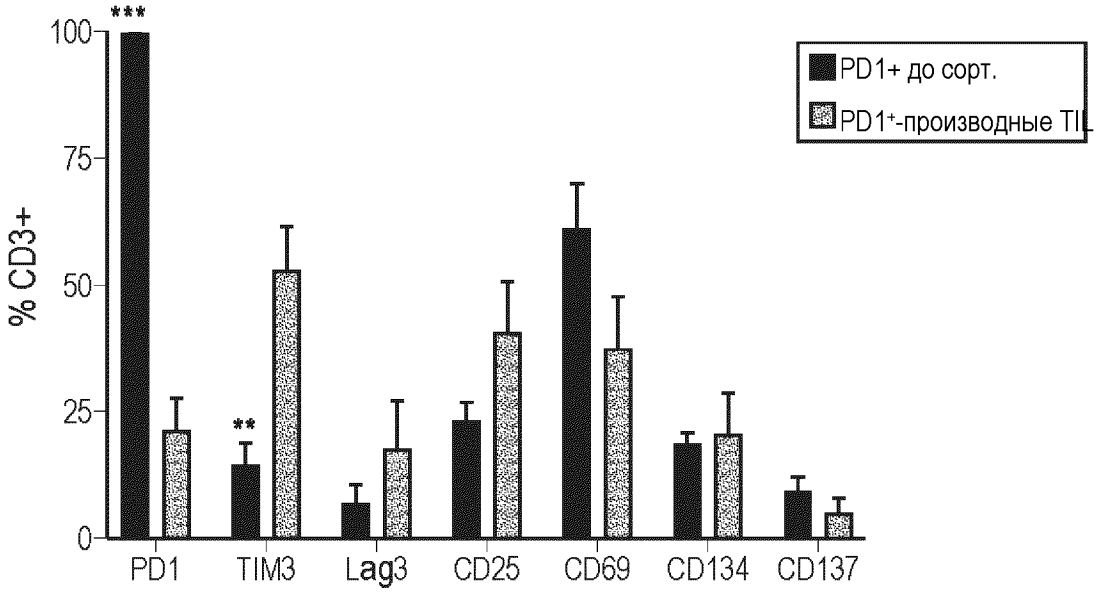
ФИГ. 45


A)
% PD1 (от живых CD3)
100
80
60
40
20
0
Меланома
Легкого
Молочн. железы
Саркома
B)
Общее кол-во клеток (PD1+TIL)
2x10^11
1.5x10^11
1x10^11
5x10^10
2x10^10
1.5x10^10
1x10^10
5x10^9
1x10^9
> 77%
Меланома
Легкого
Молочн. железы
Саркома

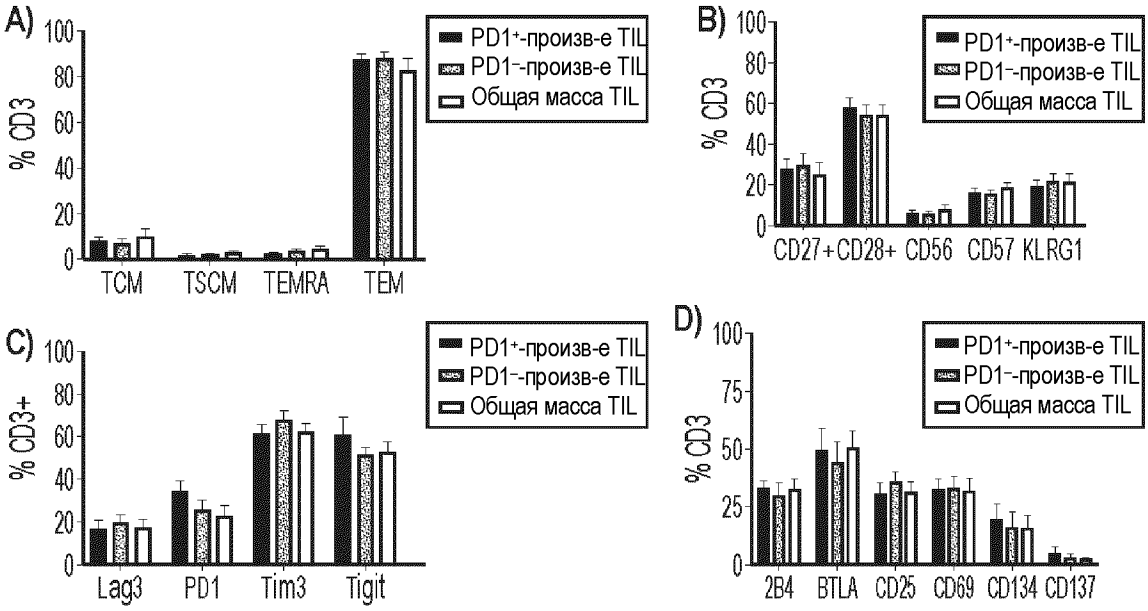
ФИГ. 46


A)
CD25
CD69
TIM-3
CD39
CD137
PD1+
PD1-
tSNE1
tSNE2
4x10^7
9x10^6
2x10^6
4x10^6
-4x10^6
B)
% CD3+
150
125
100
75
50
25
0
PD1+ до сорт
PD1- до сорт
CD25
CD69
CD134
CD137
GITR
C)
Lag3
PD1
Tigit
TIM3
CD39

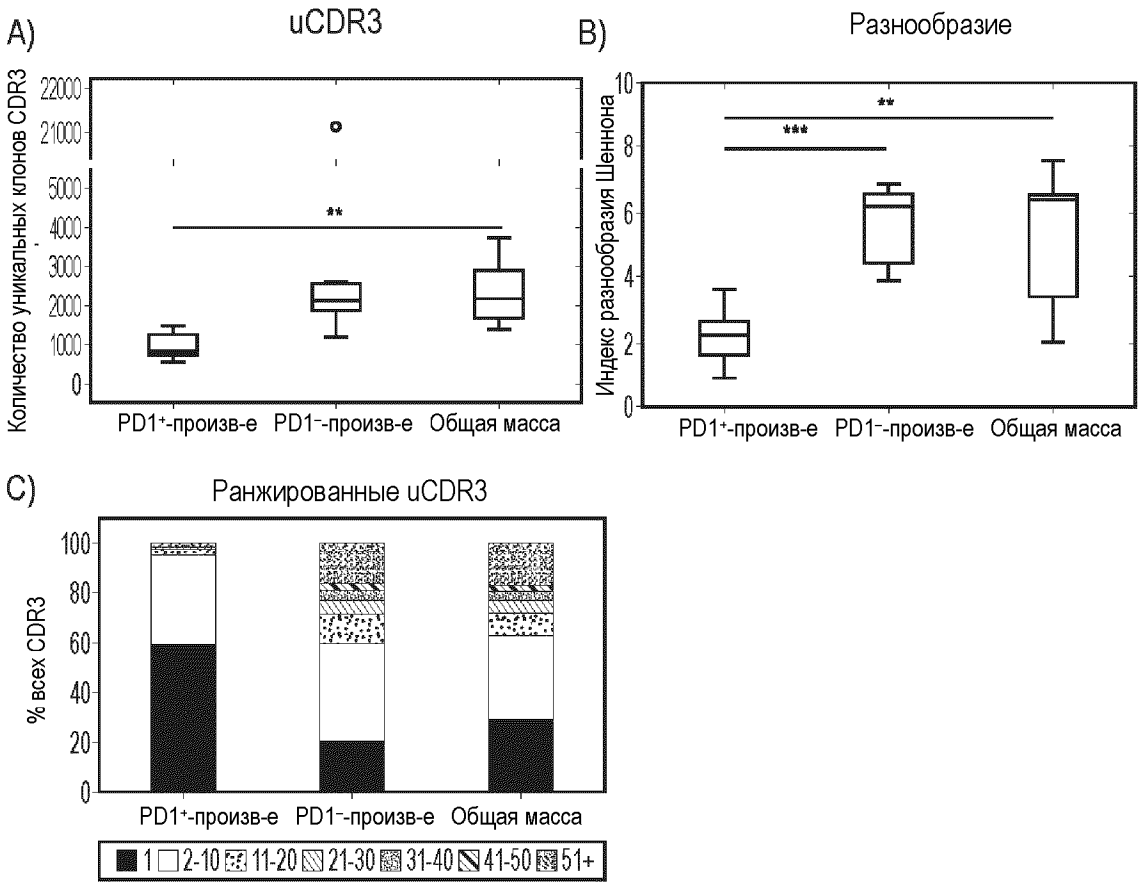
ФИГ. 47


***
**
100
75
50
25
0
% CD3+
PD1+ до сорт.
PD1+-производные TIL
PD1
TIM3
Lag3
CD25
CD69
CD134
CD137

ФИГ. 48


A)
% CD3
100
80
60
40
20
0
TCM
TSCM
TEMRA
TEM
PD1+-произв-е TIL
PD1−-произв-е TIL
Общая масса TIL
B)
% CD3
CD27+CD28+
CD56
CD57
KLRG1
C)
% CD3+
Lag3
PD1
Tim3
Tigit
D)
% CD3
75
50
25
2B4
BTLA
CD25
CD69
CD134
CD137

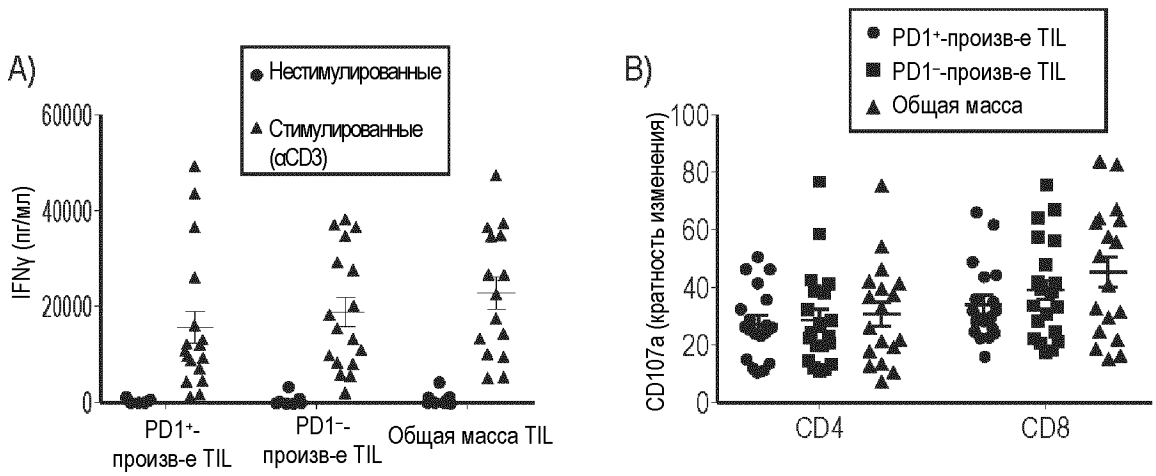
ФИГ. 49



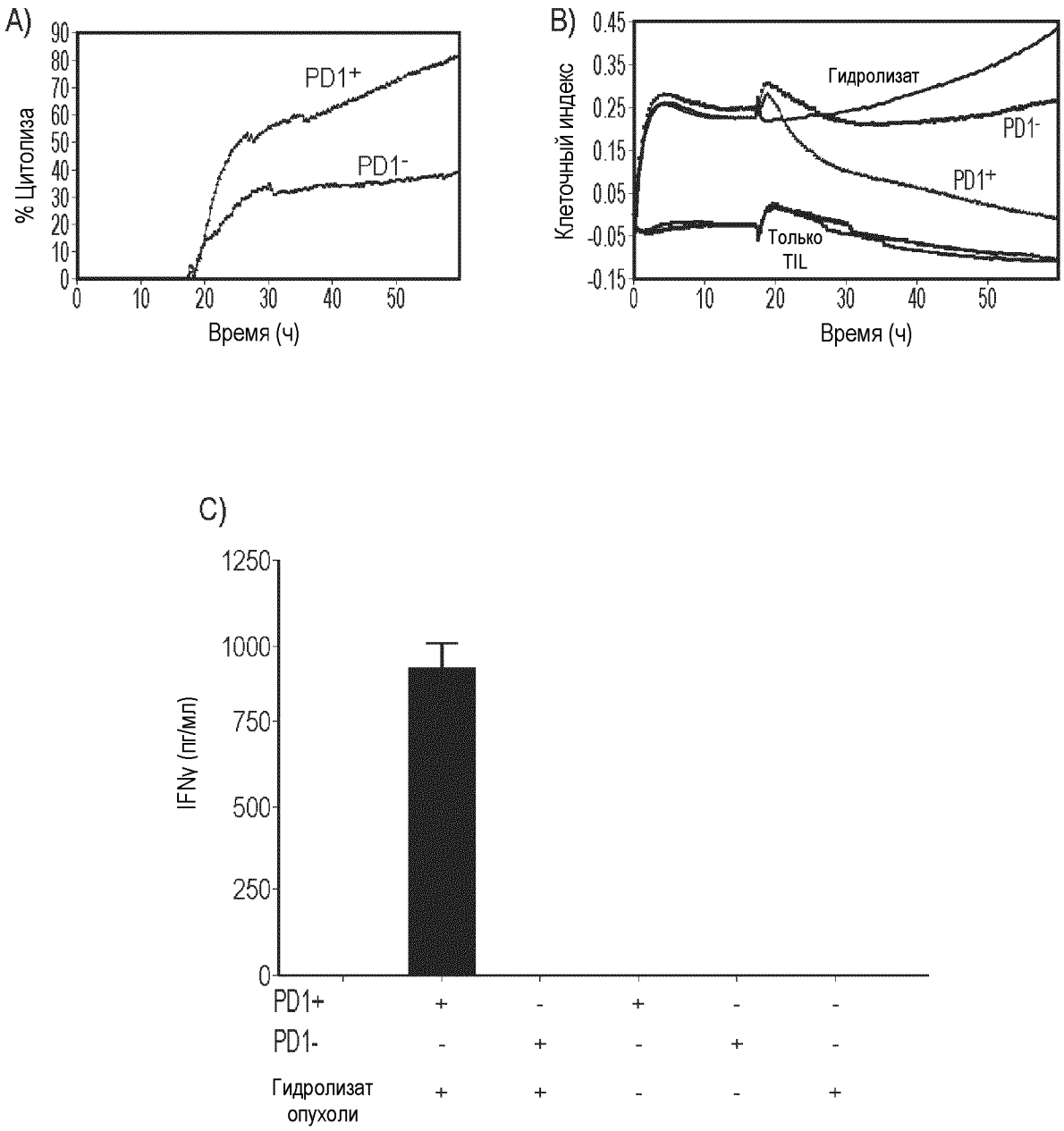
C) *Общие клоны для общей массы TIL и PD1^{+}-производных TIL*

Опухоль	**Количество общих клонов uCDR3**	**% общих для общей массы TIL**	**% общих PD1+-производных**
Молочной железы	43	0,61	78,95
Молочной железы	76	79,51	88,64
Легкого	40	5,26	35,16
Легкого	60	4,66	34,57
Меланома	59	21,14	53,84
Меланома	39	19,87	71,90

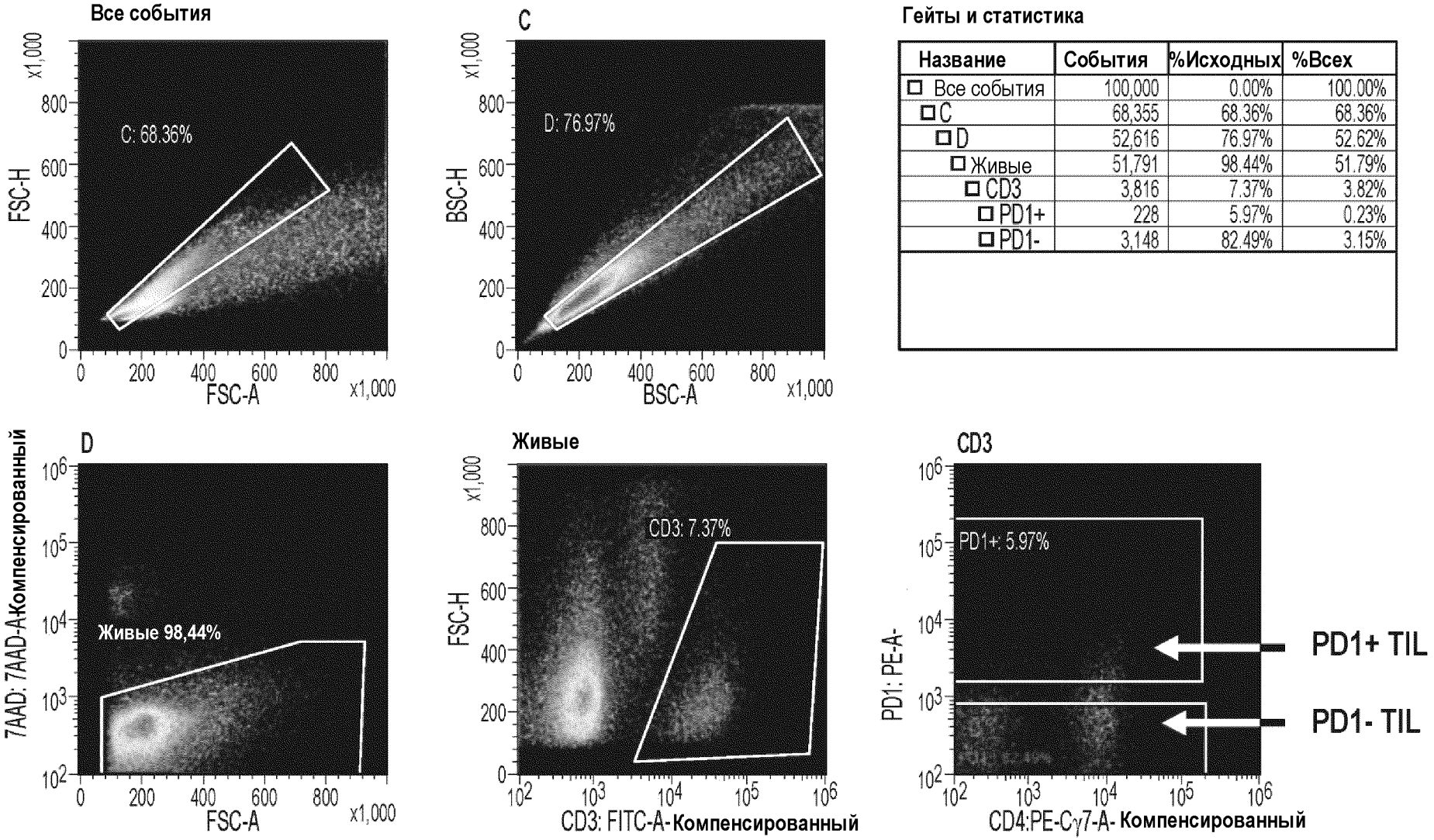
ФИГ. 50


A)
Нестимулированные
Стимулированные (αCD3)
IFNγ (пг/мл)
60000
40000
20000
0
PD1+-произв-е TIL
PD1−-произв-е TIL
Общая масса TIL
B)
PD1+-произв-е TIL
PD1−-произв-е TIL
Общая масса
CD107a (кратность изменения)
100
80
60
40
20
0
CD4
CD8

ФИГ. 51


A)
% Цитолиза
PD1+
PD1-
Время (ч)
B)
Клеточный индекс
Гидролизат
PD1-
PD1+
Только TIL
Время (ч)
C)
IFNγ (пг/мл)
PD1+
PD1-
Гидролизат опухоли

ФИГ. 52


Все события
FSC-H
FSC-A
x1,000
C: 68.36%
C
BSC-H
BSC-A
D: 76.97%
Гейты и статистика
Название | События | %Исходных | %Всех
Все события | 100,000 | 0.00% | 100.00%
C | 68,355 | 68.36% | 68.36%
D | 52,616 | 76.97% | 52.62%
Живые | 51,791 | 98.44% | 51.79%
CD3 | 3,816 | 7.37% | 3.82%
PD1+ | 228 | 5.97% | 0.23%
PD1- | 3,148 | 82.49% | 3.15%
D
7AAD: 7AAD-A-Компенсированный
Живые 98,44%
Живые
CD3: 7.37%
CD3: FITC-A- Компенсированный
CD3
PD1: PE-A-
PD1+: 5.97%
CD4:PE-Cγ7-A- Компенсированный
PD1+ TIL
PD1- TIL

ФИГ. 53

Способ 1*: 10 нг/мл коллагеназы
1 мг/мл гиалуронидазы
500 МЕ/мл ДНКазы I

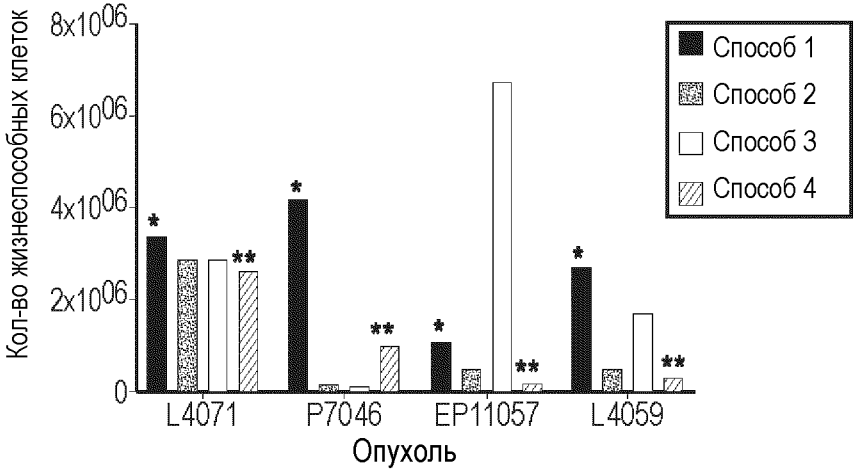
Способ 2: 10 нг/мл коллагеназы

Способ 3: Набор для гидролиза опухолей от Miltenyi

Способ 4:** 170 мг/л коллагеназы I
56 мг/л коллагеназы II
170 мг/л коллагеназы IV
25 мг/л эластазы

* NIH Centers for Cancer Research, *Triple Enzyme Mouse Tumor Digestion.* 2006. **https://ccr.cancer.gov/sites/default/files/triple enzyme mouse tumor digestion.pdf**

**Quatromoni et al. An optimized disaggregation method for human lung tumors that preserves phenotype and function of immune cells. J Leukoc Biol. 2015 Jan: 97 (1): 201-209



Способ 1 обеспечил самые большие количества клеток и самую большую долю Т-клеток

ФИГ. 54

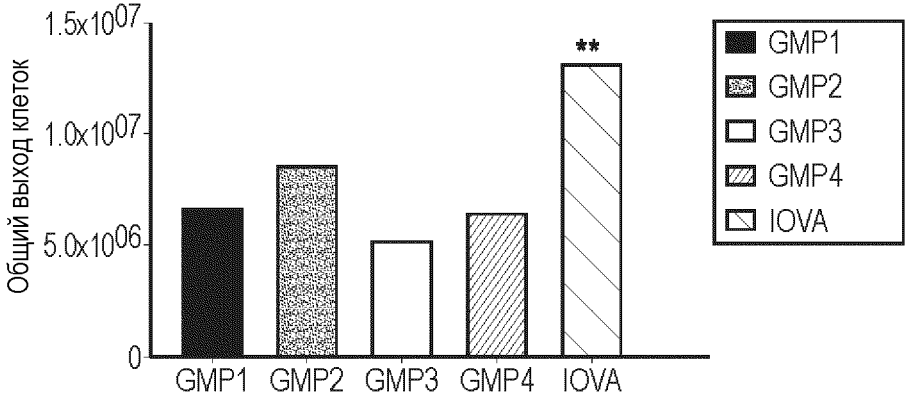
Способ 1: 0,008 DMC-Ед/мл нейтральной протеазы
0,12 PZ-Ед/мл коллагеназы
200 МЕ/мл ДНКазы I

Способ 2: 0,008 DMC-Ед/мл нейтральной протеазы
5,5 PZ-Ед/мл коллагеназы
200 МЕ/мл ДНКазы I

Способ 3: 0,36 DMC-Ед/мл нейтральной протеазы
0,12 PZ-Ед/мл коллагеназы
200 МЕ/мл ДНКазы I

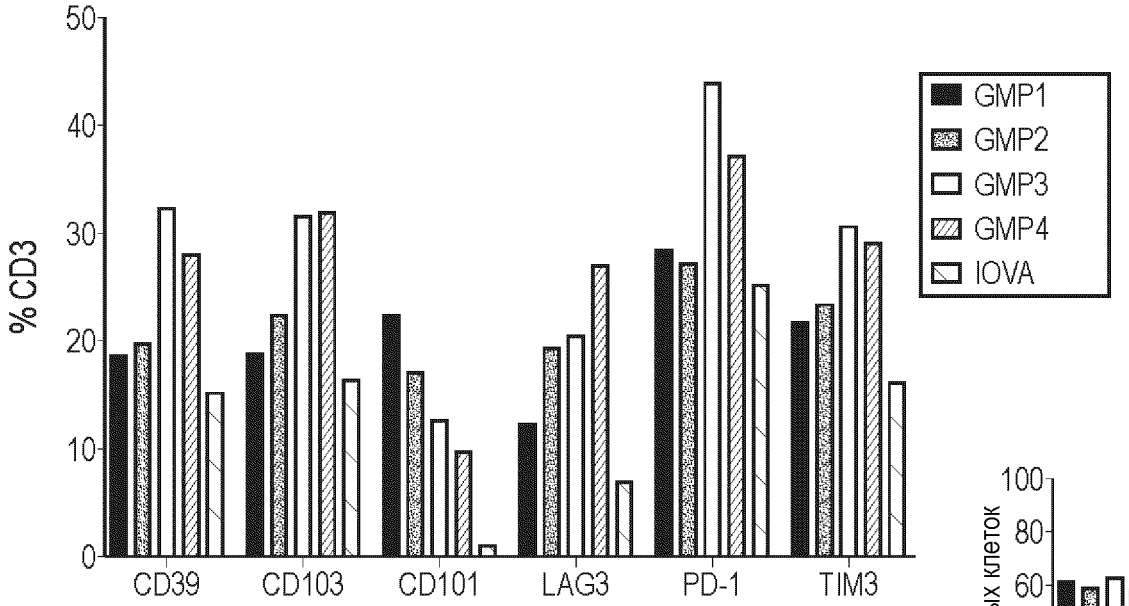
Способ 4: 0,36 DMC-Ед/мл нейтральной протеазы
5,5 PZ-Ед/мл коллагеназы
200 МЕ/мл ДНКазы I

Способ 5: 10 нг/мл коллагеназы
1 мг/мл гиалуронидазы
500 МЕ/мл ДНКазы I



**Вероятно аналогичные условиям GMP количества клеток. Для условия IOVA использовали больше опухоли, так как это условие использовали для сортировки. В будущих экспериментах будет произведено нормирование к массе опухоли

ФИГ. 55



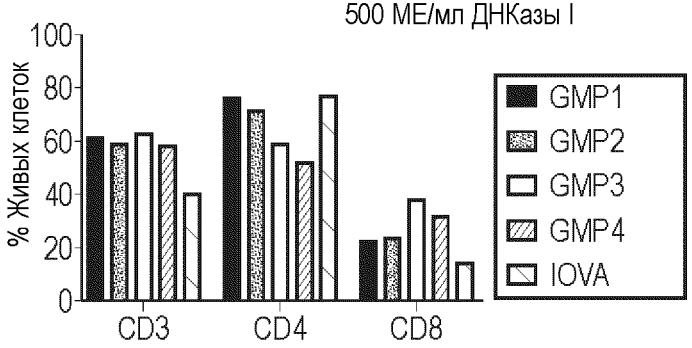
Способ 1: 0,008 DMC-Ед/мл нейтральной протеазы
0,12 PZ-Ед/мл коллагеназы
200 МЕ/мл ДНКазы I

Способ 2: 0,008 DMC-Ед/мл нейтральной протеазы
5,5 PZ-Ед/мл коллагеназы
200 МЕ/мл ДНКазы I

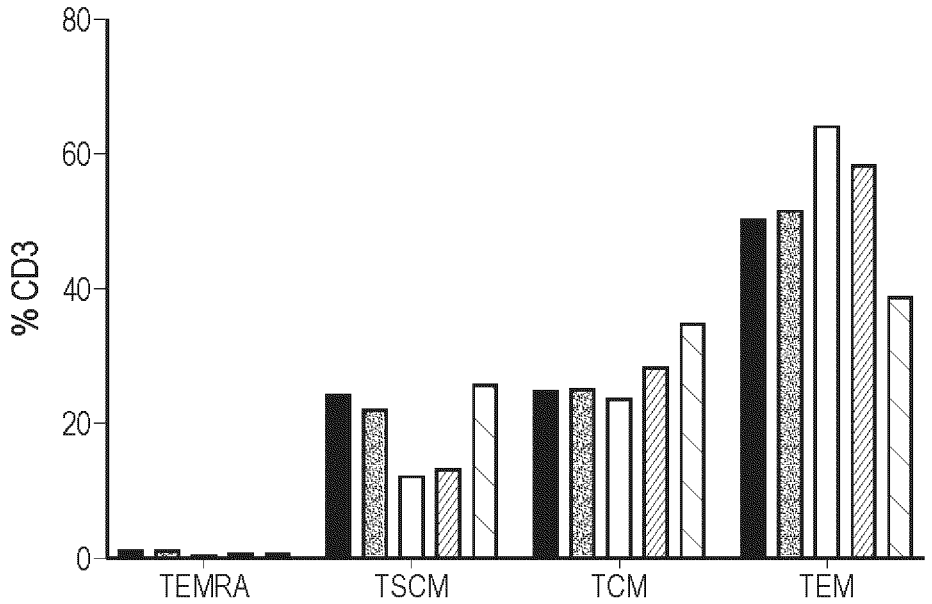
Способ 3: 0,36 DMC-Ед/мл нейтральной протеазы
0,12 PZ-Ед/мл коллагеназы
200 МЕ/мл ДНКазы I

Способ 4: 0,36 DMC-Ед/мл нейтральной протеазы
5,5 PZ-Ед/мл коллагеназы
200 МЕ/мл ДНКазы I

Способ 5: 10 нг/мл коллагеназы
1 мг/мл гиалуронидазы
500 МЕ/мл ДНКазы I



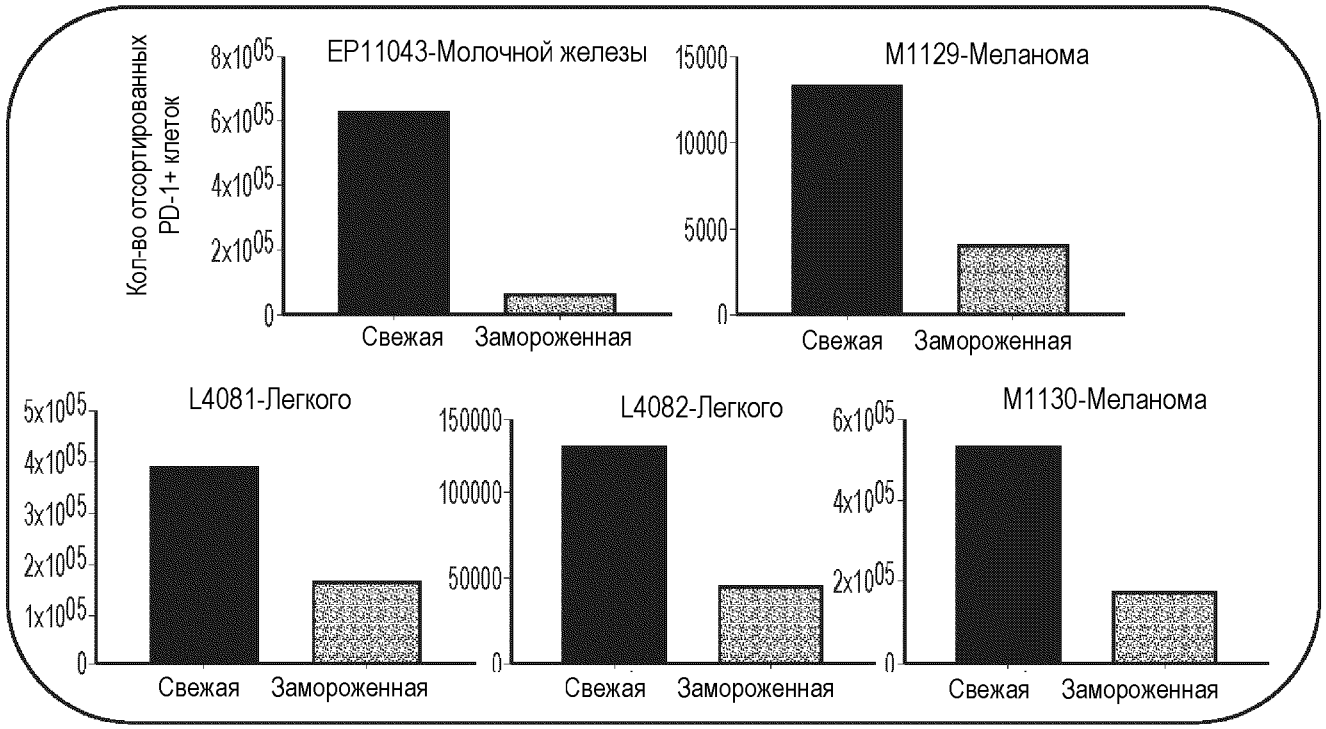
ФИГ. 56



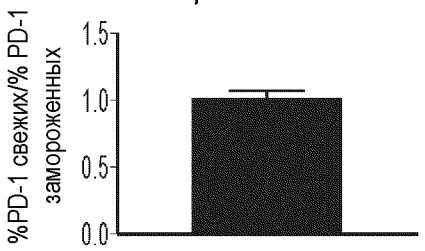
Способ 1: 0,008 DMC-Ед/мл нейтральной протеазы
0,12 PZ-Ед/мл коллагеназы
200 МЕ/мл ДНКазы I
Способ 2: 0,008 DMC-Ед/мл нейтральной протеазы
5,5 PZ-Ед/мл коллагеназы
200 МЕ/мл ДНКазы I
Способ 3: 0,36 DMC-Ед/мл нейтральной протеазы
0,12 PZ-Ед/мл коллагеназы
200 МЕ/мл ДНКазы I
Способ 4: 0,36 DMC-Ед/мл нейтральной протеазы
5,5 PZ-Ед/мл коллагеназы
200 МЕ/мл ДНКазы I
Способ 5: 10 нг/мл коллагеназы
1 мг/мл гиалуронидазы
500 МЕ/мл ДНКазы I

ФИГ. 54

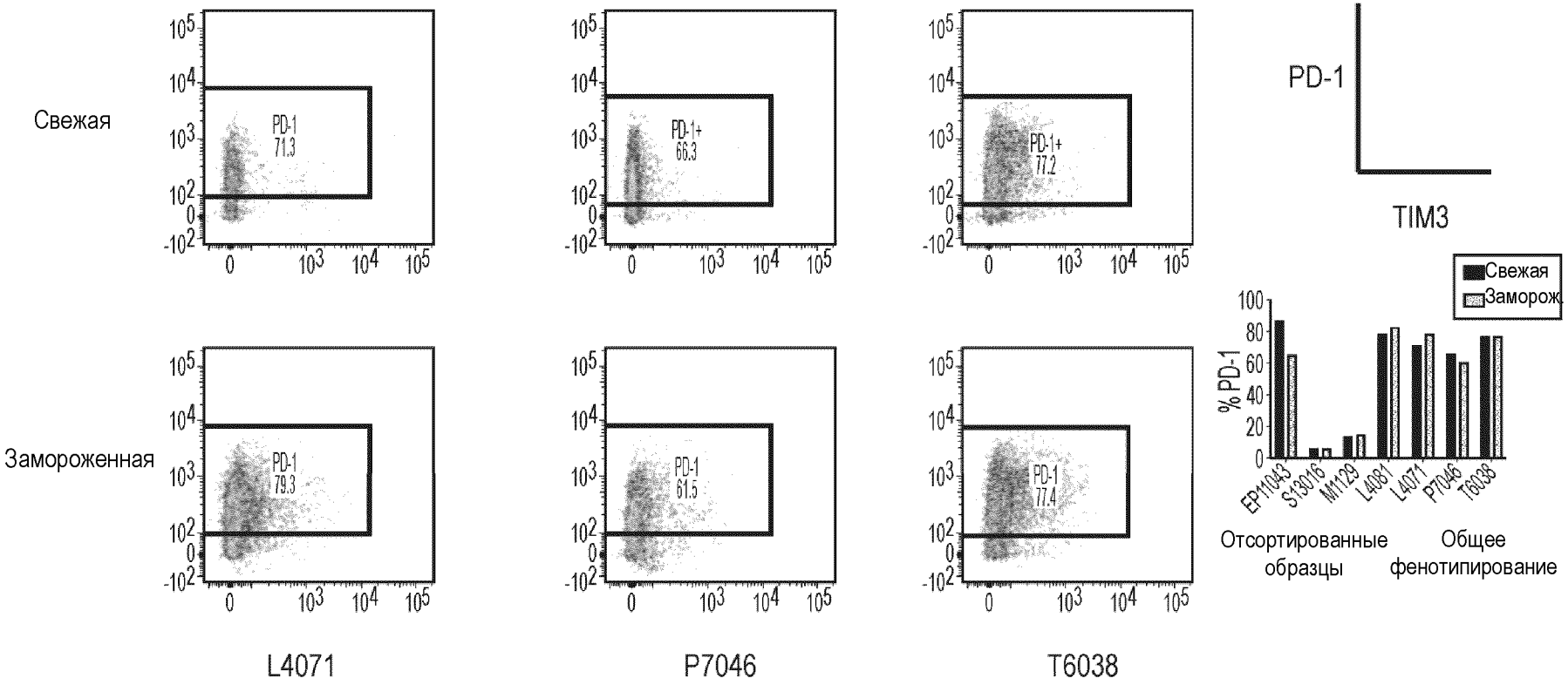
Общее количество отсортированных PD1+ клеток



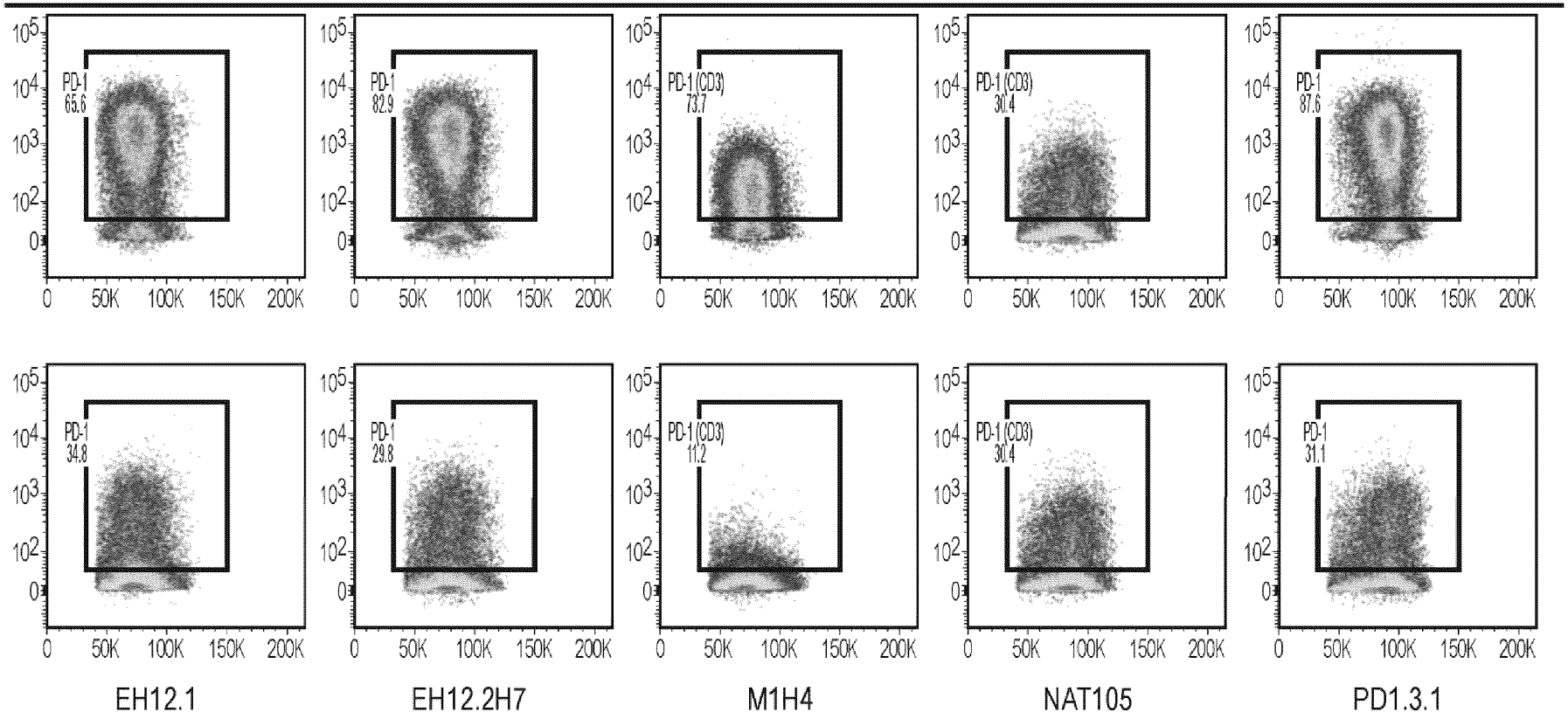
Частота встречаемости PD1+ клеток в свежих гидролизатах опухолей по сравнению с замороженными



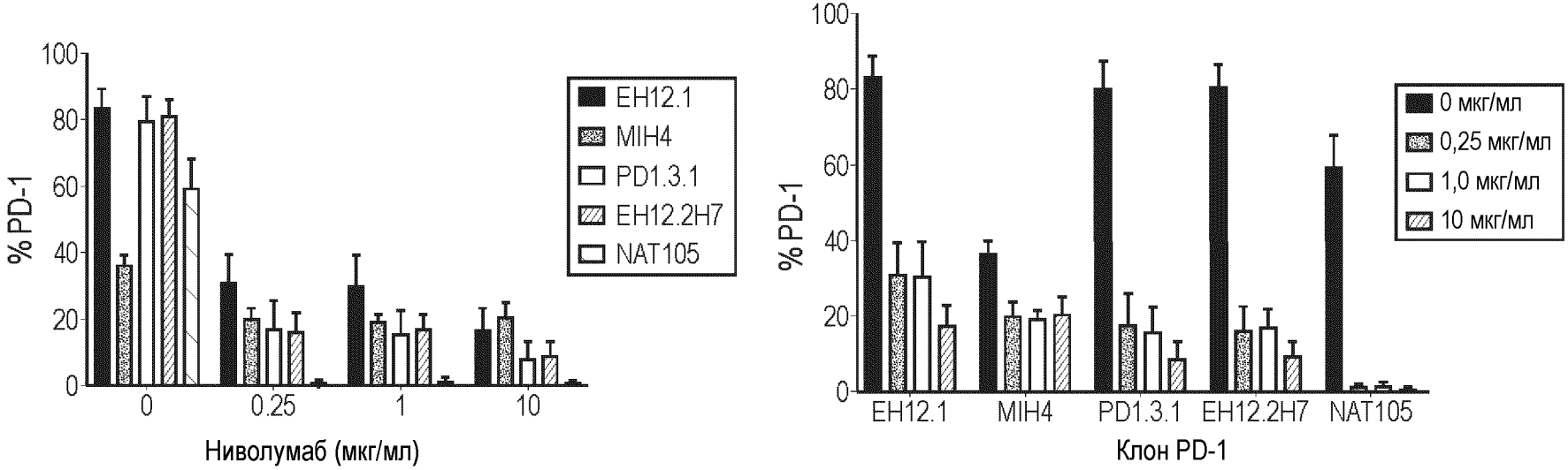
ФИГ. 58


Свежая
Замороженная
PD-1
71.3
PD-1+
66.3
PD-1+
77.2
PD-1
79.3
PD-1
61.5
PD-1
77.4
L4071
P7046
T6038
PD-1
TIM3
Свежая
Заморож
% PD-1
EP11043
S13016
M1129
L4081
L4071
P7046
T6038
Отсортированные образцы
Общее фенотипирование

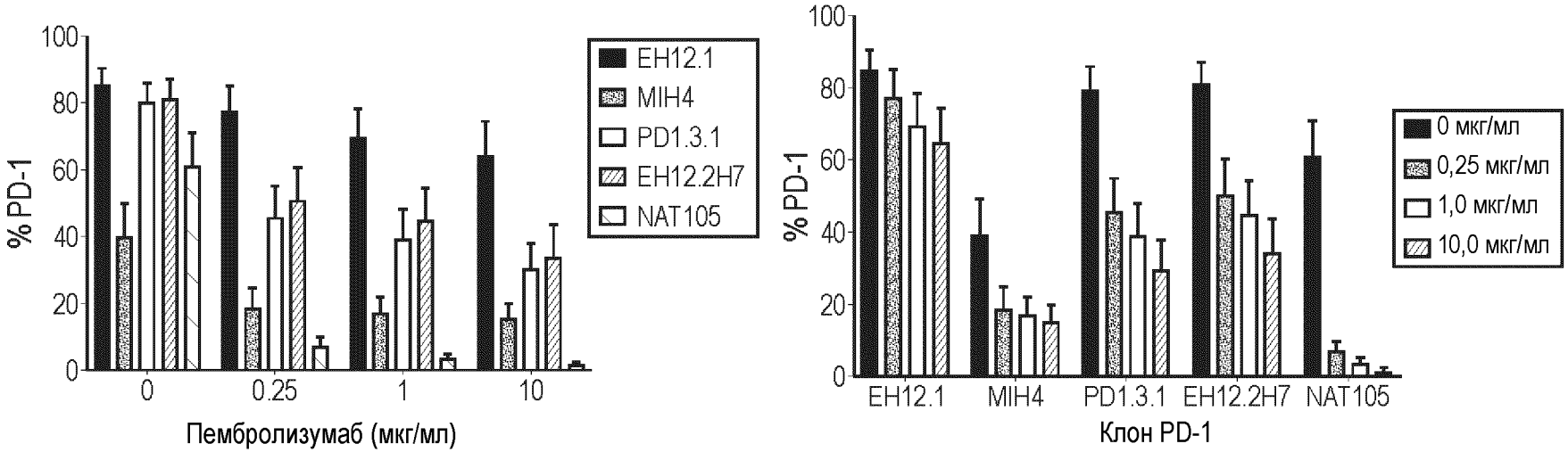
ФИГ. 59


PD-1
65.6
PD-1
82.9
PD-1 (CD3)
73.7
PD-1 (CD8)
30.4
PD-1
87.6
PD-1
34.8
PD-1
29.8
PD-1 (CD3)
11.2
PD-1 (CD8)
30.4
PD-1
31.1
0
50K
100K
150K
200K
EH12.1
EH12.2H7
M1H4
NAT105
PD1.3.1

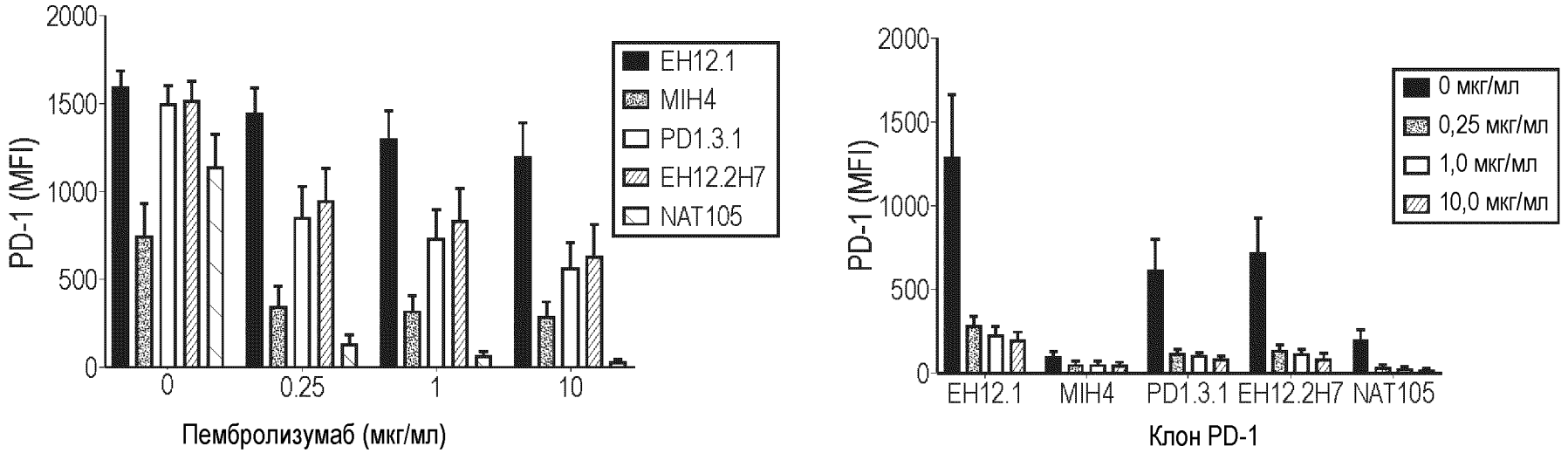
ФИГ. 60


100
80
60
40
20
0
% PD-1
0
0.25
1
10
Ниволумаб (мкг/мл)
EH12.1
MIH4
PD1.3.1
EH12.2H7
NAT105
0 мкг/мл
0,25 мкг/мл
1,0 мкг/мл
10 мкг/мл
EH12.1
MIH4
PD1.3.1
EH12.2H7
NAT105
Клон PD-1

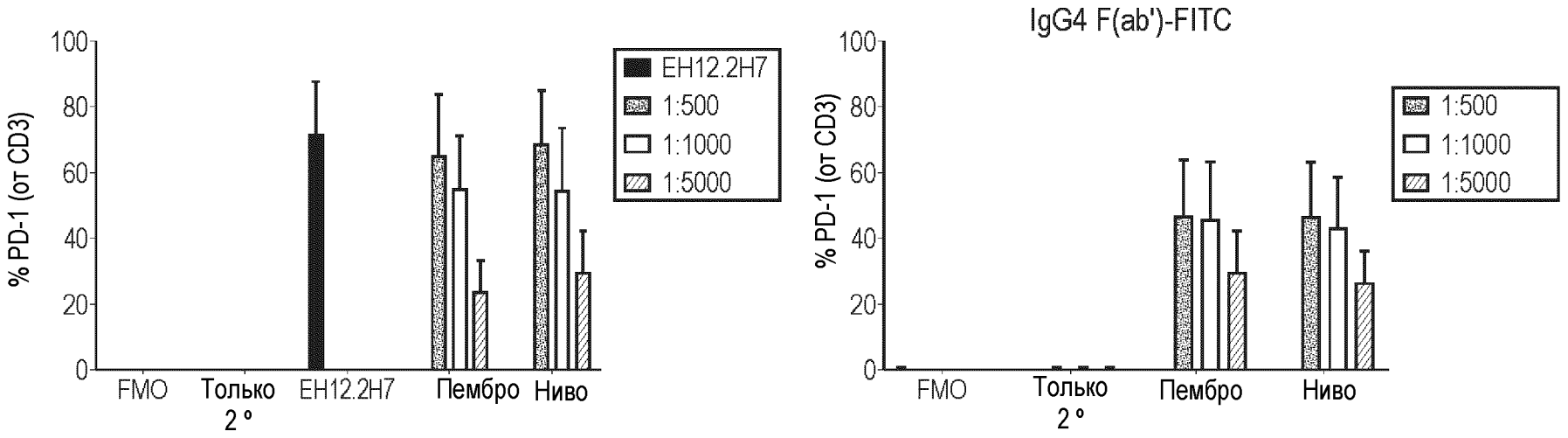
ФИГ. 61


100
80
60
40
20
0
% PD-1
0
0.25
1
10
Пембролизумаб (мкг/мл)
EH12.1
MIH4
PD1.3.1
EH12.2H7
NAT105
0 мкг/мл
0,25 мкг/мл
1,0 мкг/мл
10,0 мкг/мл
EH12.1
MIH4
PD1.3.1
EH12.2H7
NAT105
Клон PD-1

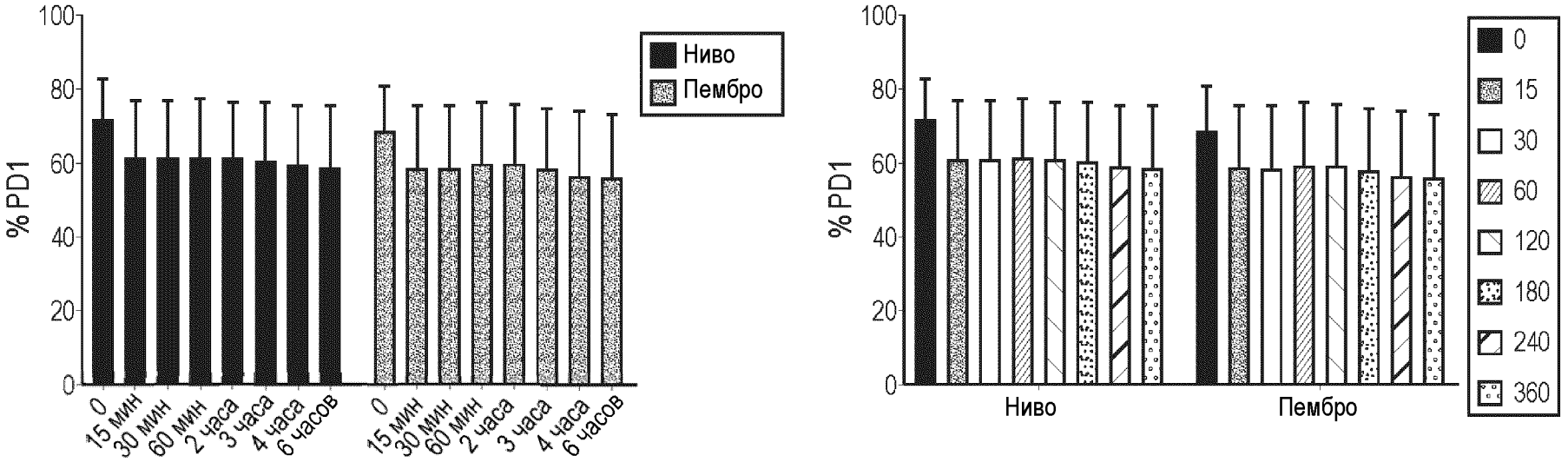
ФИГ. 62


2000
1500
1000
500
0
PD-1 (MFI)
0
0.25
1
10
Пембролизумаб (мкг/мл)
EH12.1
MIH4
PD1.3.1
EH12.2H7
NAT105
0 мкг/мл
0,25 мкг/мл
1,0 мкг/мл
10,0 мкг/мл
EH12.1
MIH4
PD1.3.1
EH12.2H7
NAT105
Клон PD-1

ФИГ. 63


% PD-1 (от CD3)
100
80
60
40
20
0
FMO
Только 2 °
EH12.2H7
Пембро
Ниво
EH12.2H7
1:500
1:1000
1:5000
IgG4 F(ab')-FITC
% PD-1 (от CD3)
100
80
60
40
20
0
FMO
Только 2 °
Пембро
Ниво
1:500
1:1000
1:5000

ФИГ. 64


100
80
60
40
20
0
% PD1
Ниво
Пембро
0
15 мин
30 мин
60 мин
2 часа
3 часа
4 часа
6 часов
0
15
30
60
120
180
240
360

ФИГ. 65

	M1121	M1123	M1125	M1126	M1129	M1130	EP11032	EP11040	EP11043
%PD1+	10.1%	0.66%	47.6%	0.78%	13.9%	59.5%	16.3%	33.5%	87%
Кол-во отсортир.	30,231	2,000	143,000	3,000	13,393	529,000	23,415	5,693	628,000
Чистота после сортир.	NT	86%	62%	35%	73%	96%	NT	96%	94.6%
Высеяно REP1 (кол-во/G-Rex24/10)	30,231	2,000	19,000	3,000	13,393	100,000	23,415	5,693	92,000
Выход PD1+ в REP1	1.9e7	8.0e5	8.21e5	1.5e7	1.5e7	2.3e7	2.63e7	1.3e6	1.33e6
Кратность экспансии	628	400	43	5000	1045	230	1,123	228	15
Высеяно REP2 (кол-во/G-Rex10/100M)	100,000	80,000	100,000	100,000	100,000	100,000	100,000	100,000	100,000
Выход PD1+ в REP2	1.44e8 (~27e9)	3.0e6 (~3e7)	3.03e7 (~2/5e8)	9.48e7 (~14e9)	1.28e8 (~192e9)	2.38e8 (~203e9)	1.68e8 (~44e9)	1.26e8 (~14e9)	1.7e8 (~1.5e9)
Кратность экспансии	1,440	37.5	303	948	1280	1670	1,680	1,260	1,170

Пациенты с меланомой, получавшие лечение антителом к PD-1

© 2018, Iovance Biotherapeutics

Полномасштабное производство

ФИГ. 66

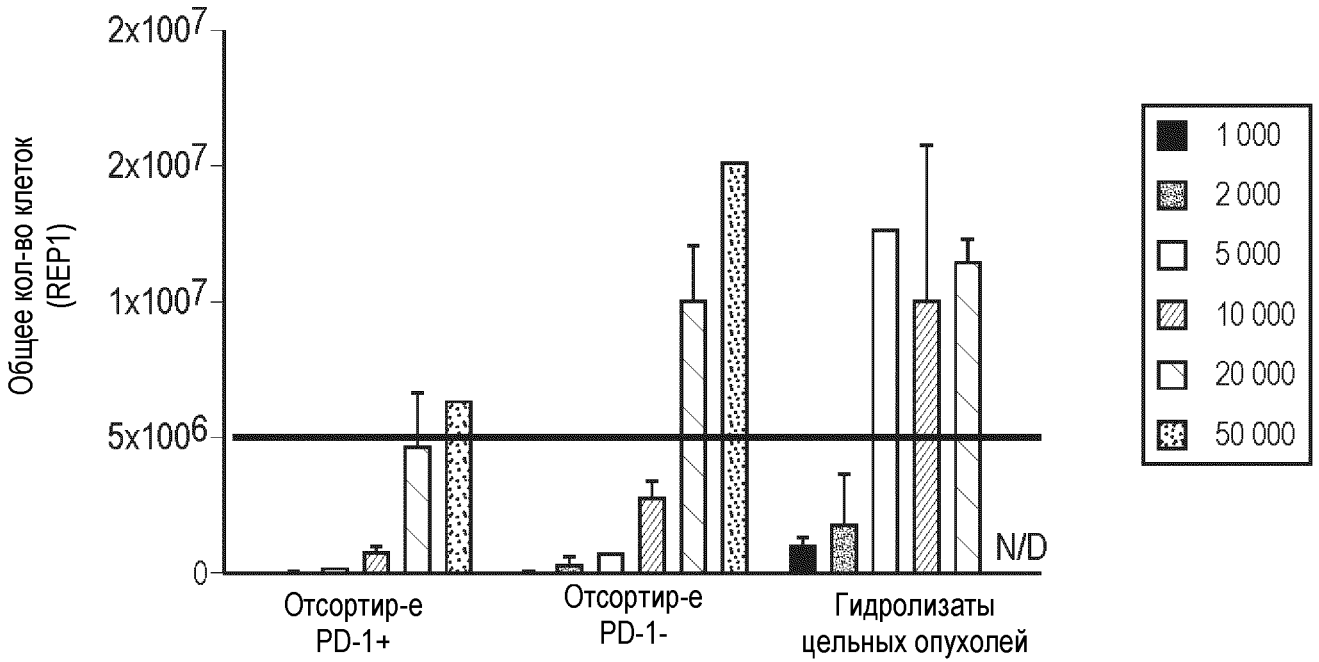
	T6042	EP11055	EP11061	L4067	L4068	L4073	*L4074*	L4075	L4081	L4082
%PD1+	33%	13.3%	5.2%	58%	4.6%	27%	6.7%	13.5%	78%	81.8%
Кол-во отсортир.	23,320	33,000	5,500	115,000	32,500	88,426	8,384	11,000	390,000	135,012
Чистота после сортир.	90%	72%	65%	95%	59.2%	78%	81%	78%	61%	90%
Высеяно REP1 (кол-во/G-Rex24/10)	23,000	1K/2K/10K 20K	5,500	100,000	32,500	10K/25K/ 50K	8,384	1K/2K/ 5K	50,000	30,000
Выход PD1+ в REP1	5.54e6	2.6e4/ 5.3e5/ 6.8e5/ 3.28e6	6.71e5	3.0e7	2.32e7	8.5e6/ 3.77e7/ 6.09e7	2.72e6	2.4e4/ 3.4e4/ 2.64e5	1.24e8	6.36e7
Кратность экспансии	240	26/61/67 164	122	300	73	850/1508/ 1218	324	25/17 /53	2480	2120
Высеяно REP2 (кол-во/G-Rex10/100M)	5.54e6	3.3e6	100,000	100,000	100,000	3.77e7	2.72e6	8.5e5	100,000	100,000
Выход PD1+ в REP2	1.82e9 (1.82e9)	1.83e9 (~1.83e9)	1.6e8 (~1.0e9)	3.63e8 (~108e9)	1.17e8 (~27e9)	3.64e8 (~2.2e9)	1.97e9 (~2e9)	1.83e8 (~2e8)	1.1e8 (~138e9)	1.99e8 (~396e9)
Кратность экспансии	328	554	1570	3,600	1170	20	724	2,152	1110	1990

ФИГ. 67

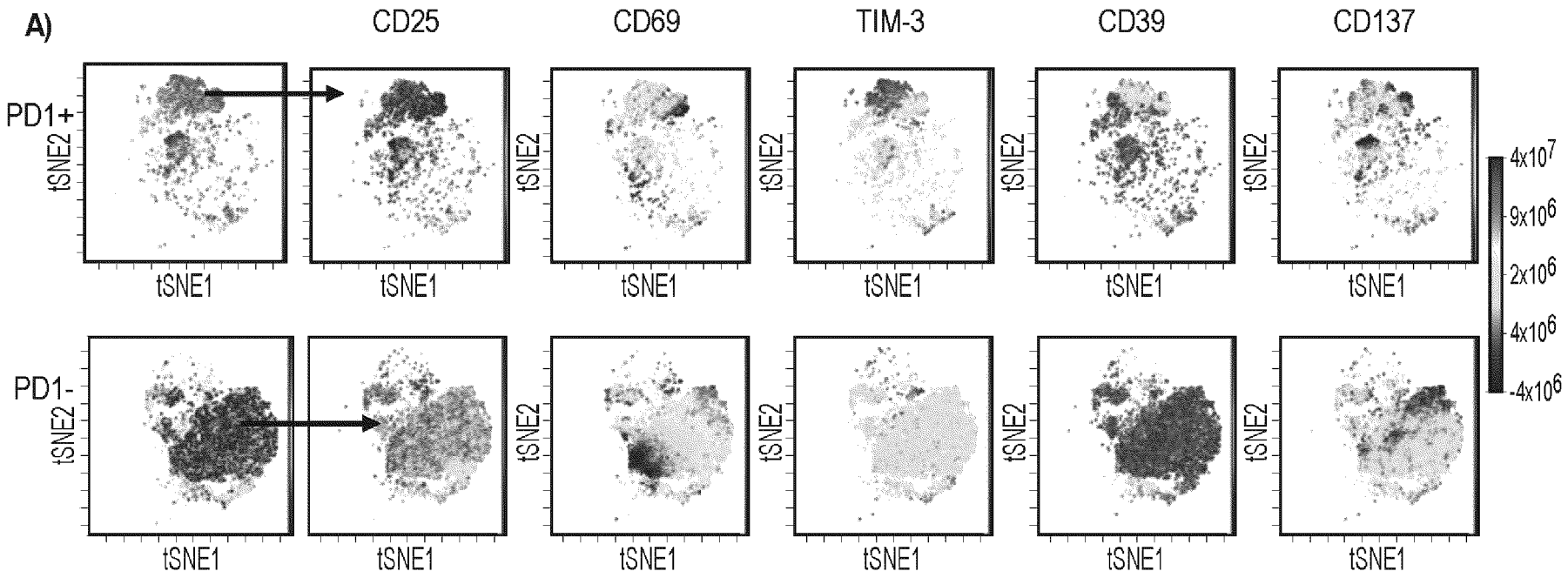
	S13009	*S13015*	*S13016*
%PD1+	8%	94%	6%
Кол-во отсортир.	80,000	290	306
Чистота после сортир.	NT	99.8%	NT
Высеяно REP1 (кол-во/G-Rex24/10)	80,000	290 (лунка$_{96}$)	306 (лунка$_{96}$)
Выход PD1+ в REP1	2.95e6	2.6e4	1.96e4
Кратность экспансии	37	90	63
Высеяно REP2 (кол-во/G-Rex10/100M)	100,000	2.6e4	2.0e4
Выход PD1+ в REP2	2.59e8 (~7e9)	4.13e7 (~4.1e7)	2.2e5 (2.2e5)
Кратность экспансии	2,685	1,588	11

В общей сложности 17/22 (2 еще выполняются) препаратов PD1+ TIL дали >1e9 жизнеспособных клеток (вероятно, указанное количество является заниженным, поскольку была отсортирована не вся опухоль)

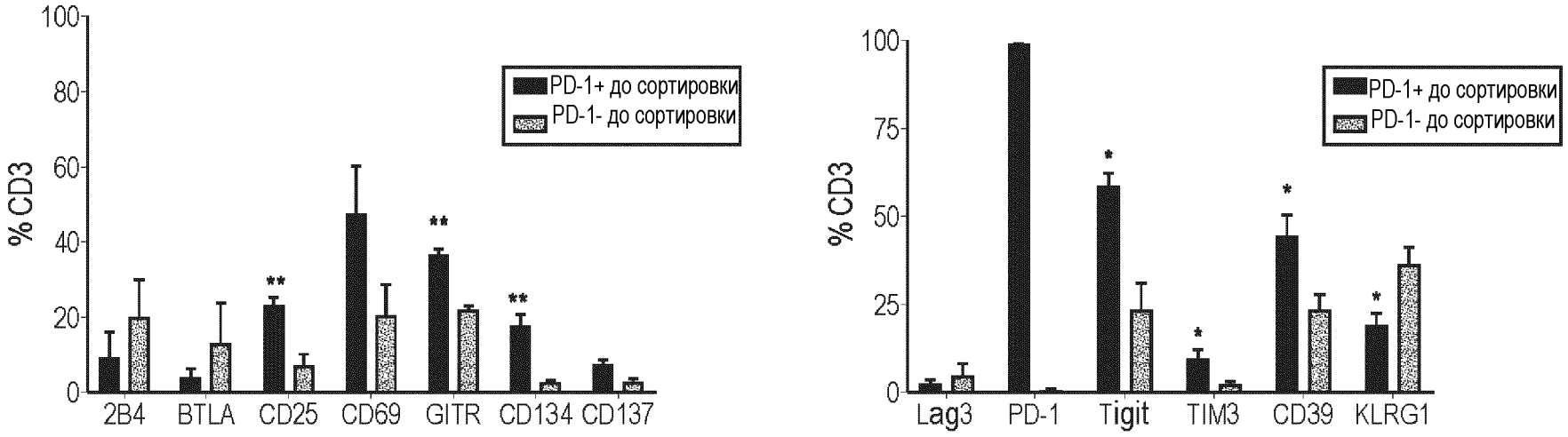
ФИГ. 68


Общее кол-во клеток (REP1)
2x10^7
2x10^7
1x10^7
5x10^6
0
N/D
Отсортир-е PD-1+
Отсортир-е PD-1-
Гидролизаты цельных опухолей
1 000
2 000
5 000
10 000
20 000
50 000

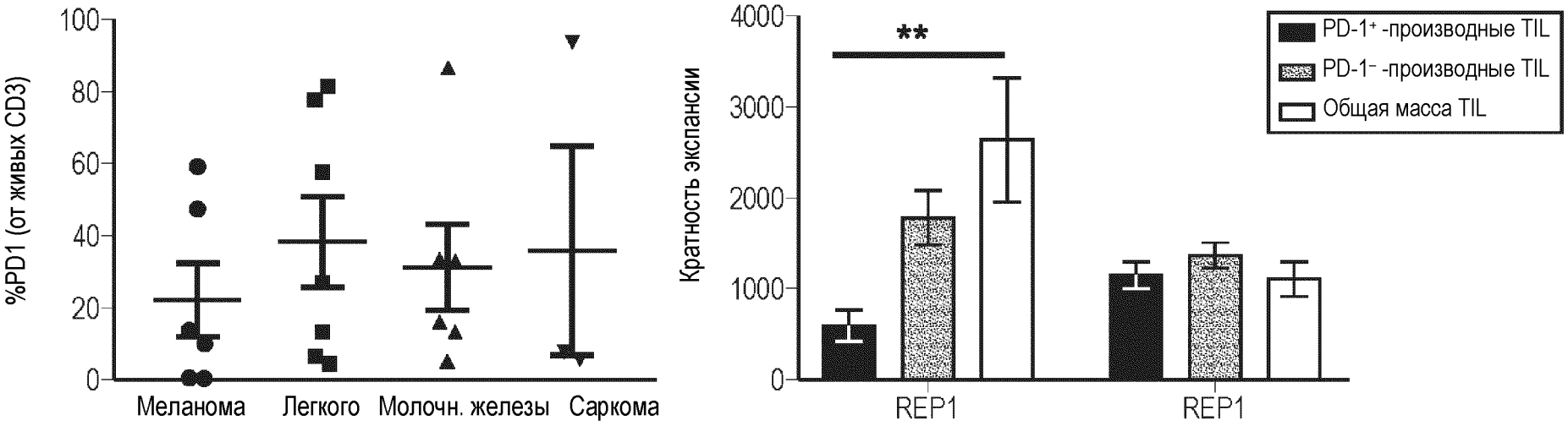
ФИГ. 69


A)
CD25
CD69
TIM-3
CD39
CD137
PD1+
PD1-
tSNE1
tSNE2
4x10^7
9x10^6
2x10^6
4x10^6
-4x10^6

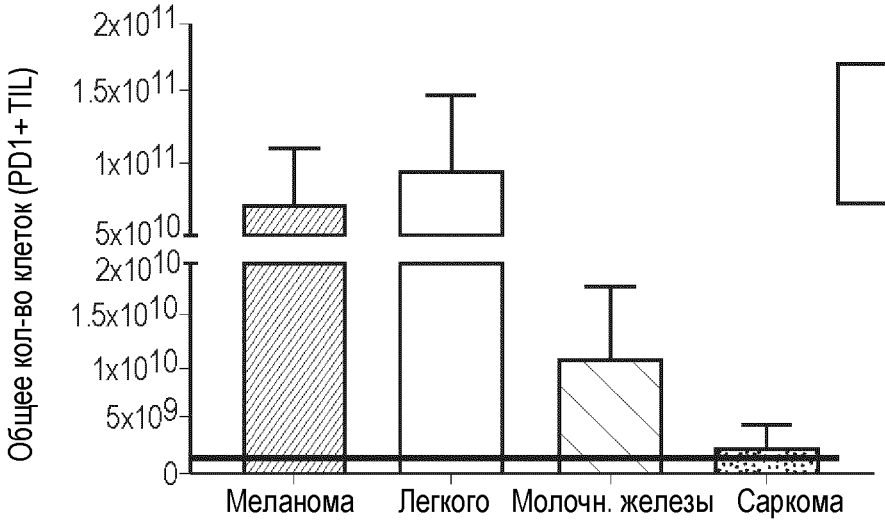
ФИГ. 70


100
80
60
40
20
0
% CD3
PD-1+ до сортировки
PD-1- до сортировки
2B4
BTLA
CD25
CD69
GITR
CD134
CD137
**
**
**
100
75
50
25
0
% CD3
PD-1+ до сортировки
PD-1- до сортировки
Lag3
PD-1
Tigit
TIM3
CD39
KLRG1
*
*
*
*

ФИГ. 71

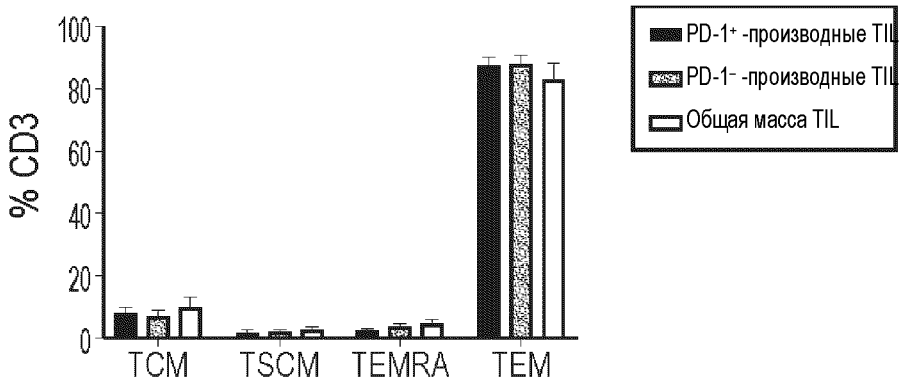

%PD1 (от живых CD3)
100
80
60
40
20
0
Меланома
Легкого
Молочн. железы
Саркома
Кратность экспансии
4000
3000
2000
1000
0
**
REP1
REP1
PD-1+ -производные TIL
PD-1- -производные TIL
Общая масса TIL

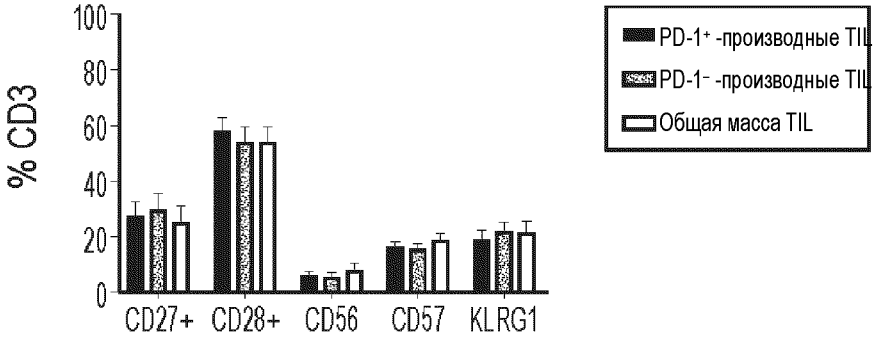
ФИГ. 72

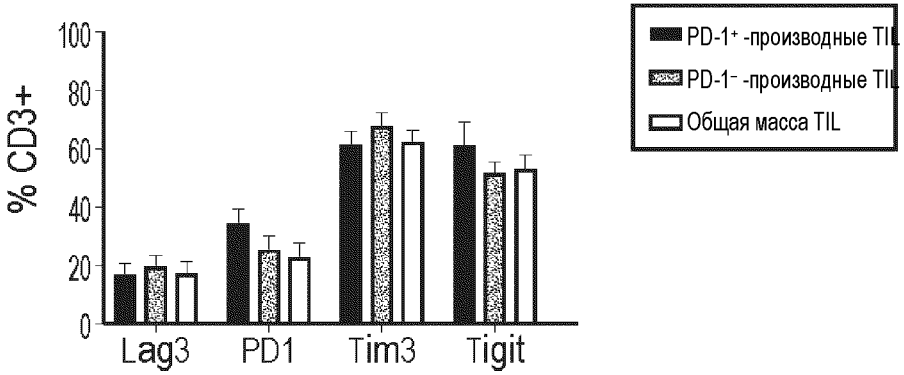


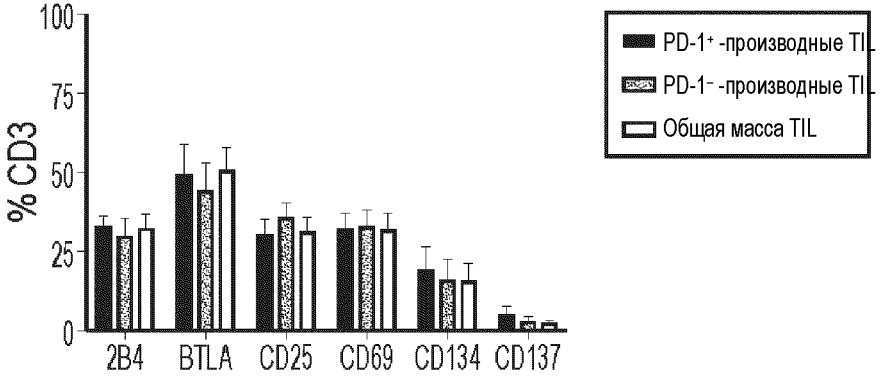
77% препаратов PD1+ TIL дали >1e9 TIL

ФИГ. 73

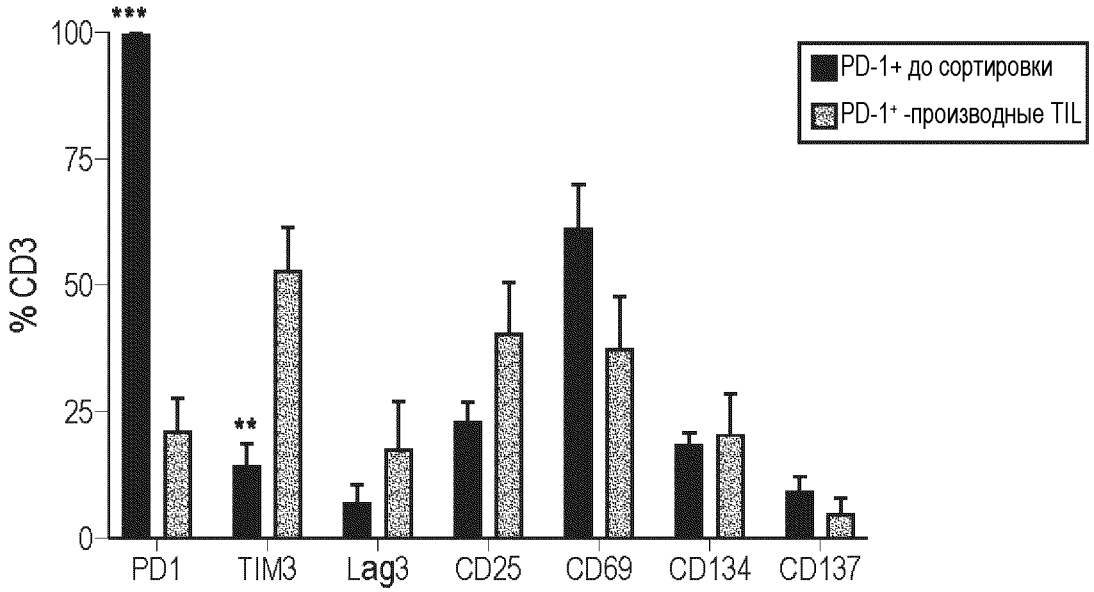

% CD3
100
80
60
40
20
0
TCM
TSCM
TEMRA
TEM
PD-1+ -производные TIL
PD-1- -производные TIL
Общая масса TIL


% CD3
100
80
60
40
20
0
CD27+
CD28+
CD56
CD57
KLRG1
PD-1+ -производные TIL
PD-1- -производные TIL
Общая масса TIL

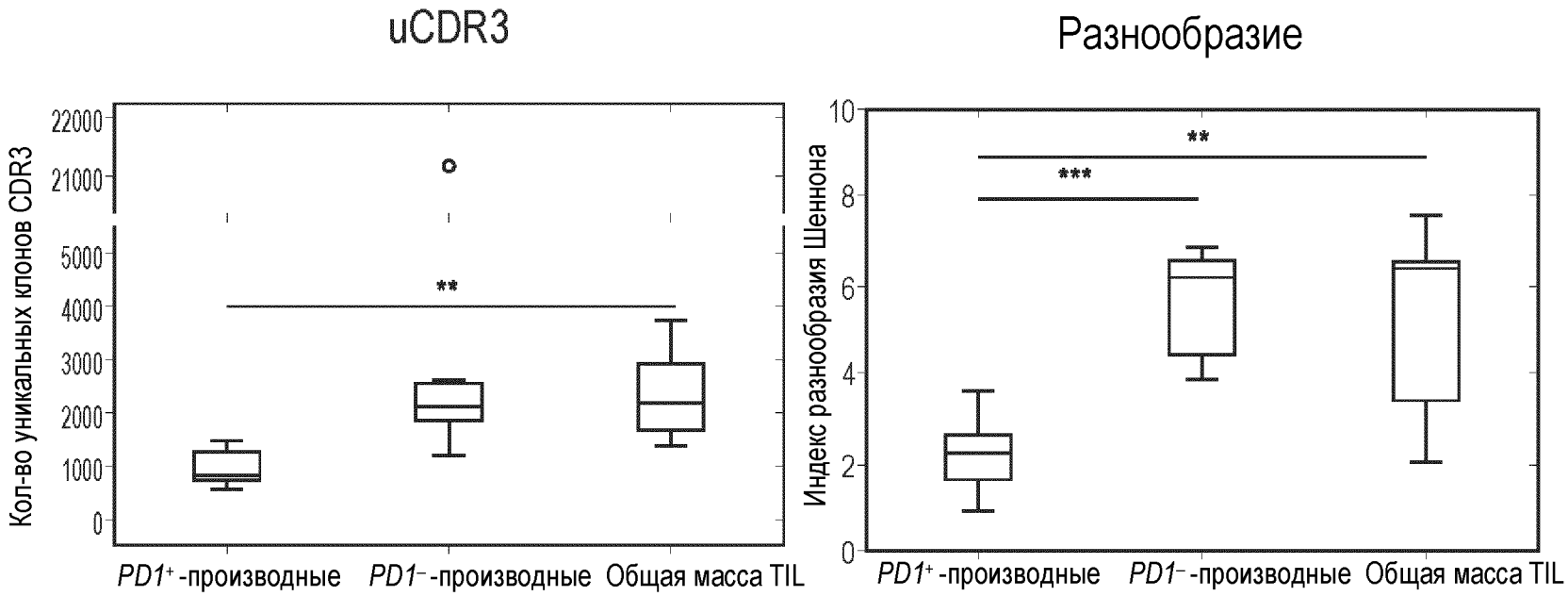

% CD3+
100
80
60
40
20
0
Lag3
PD1
Tim3
Tigit
PD-1+ -производные TIL
PD-1- -производные TIL
Общая масса TIL


% CD3
100
75
50
25
0
2B4
BTLA
CD25
CD69
CD134
CD137
PD-1+ -производные TIL
PD-1- -производные TIL
Общая масса TIL

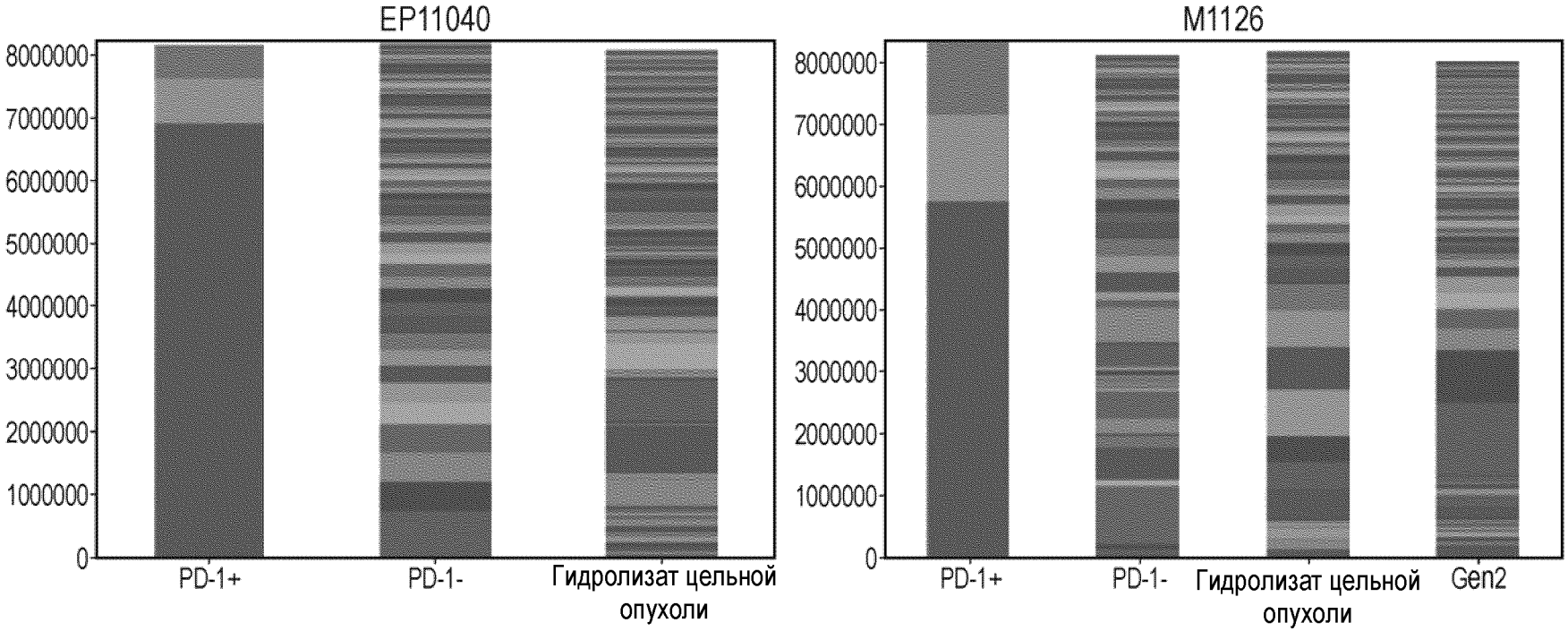
ФИГ. 74


***
**
100
75
50
25
0
% CD3
PD-1+ до сортировки
PD-1+ -производные TIL
PD1
TIM3
Lag3
CD25
CD69
CD134
CD137

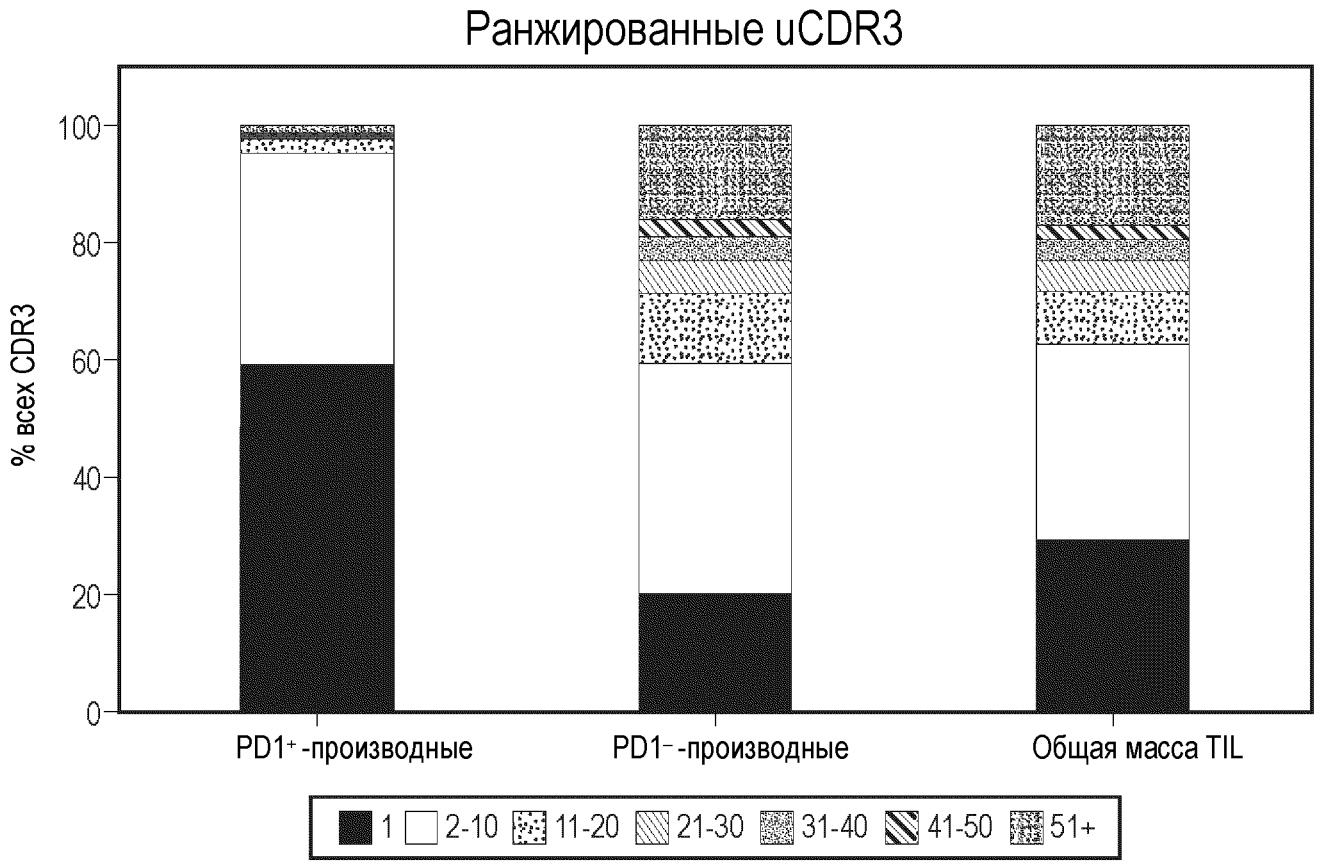
ФИГ. 75


uCDR3
Кол-во уникальных клонов CDR3
22000
21000
5000
4000
3000
2000
1000
0
**
PD1+ -производные
PD1− -производные
Общая масса TIL
Разнообразие
Индекс разнообразия Шеннона
10
8
6
4
2
0
**
***
PD1+ -производные
PD1− -производные
Общая масса TIL

ФИГ. 76


EP11040
8000000
7000000
6000000
5000000
4000000
3000000
2000000
1000000
0
PD-1+
PD-1-
Гидролизат цельной опухоли
M1126
8000000
7000000
6000000
5000000
4000000
3000000
2000000
1000000
0
PD-1+
PD-1-
Гидролизат цельной опухоли
Gen2

ФИГ. 77

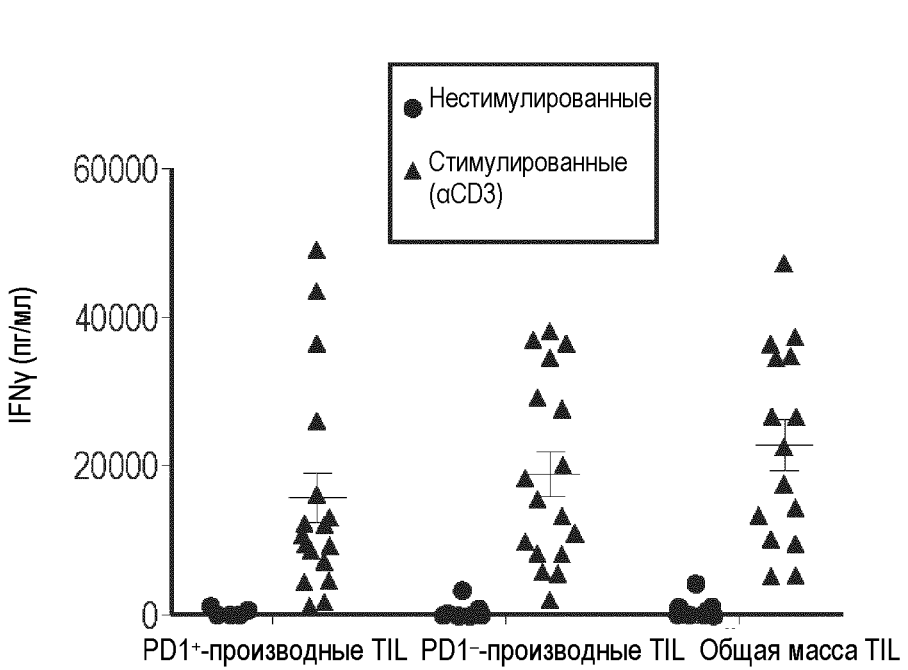

Ранжированные uCDR3
% всех CDR3
100
80
60
40
20
0
PD1+ -производные
PD1− -производные
Общая масса TIL
1
2-10
11-20
21-30
31-40
41-50
51+

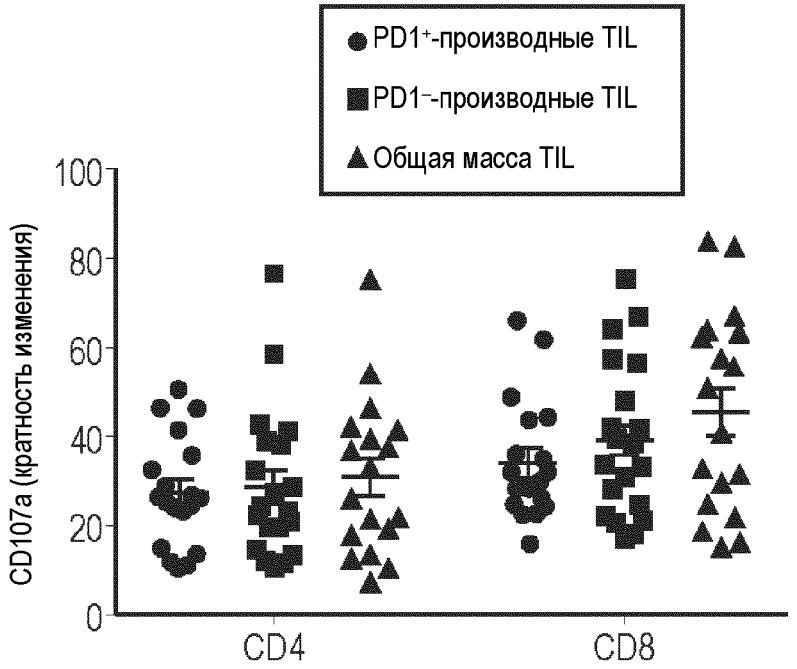
ФИГ. 78

Общие клоны для общей массы TIL и $PD1^+$ -производных

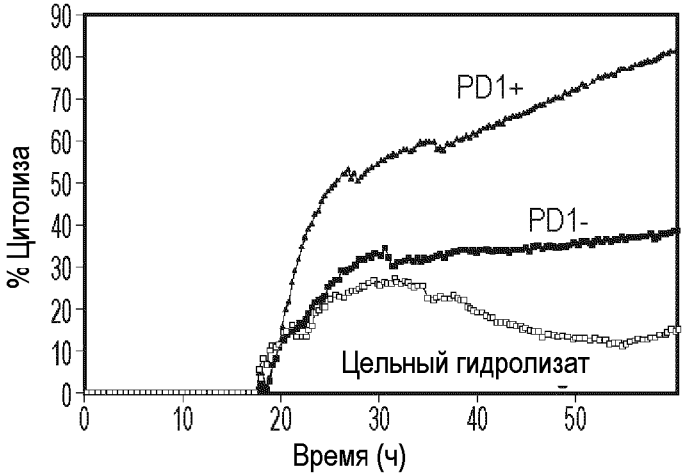
Опухоль	Количество общих клонов uCDR3	% общих для общей массы TIL	% общих для $PD1^+$ - производных
Молочной железы	43	0,61	78,95
Молочной железы	76	79,51	88,64
Легкого	40	5,26	35,16
Легкого	60	4,66	34,57
Меланома	59	21,14	53,84
Меланома	39	19,87	71,90

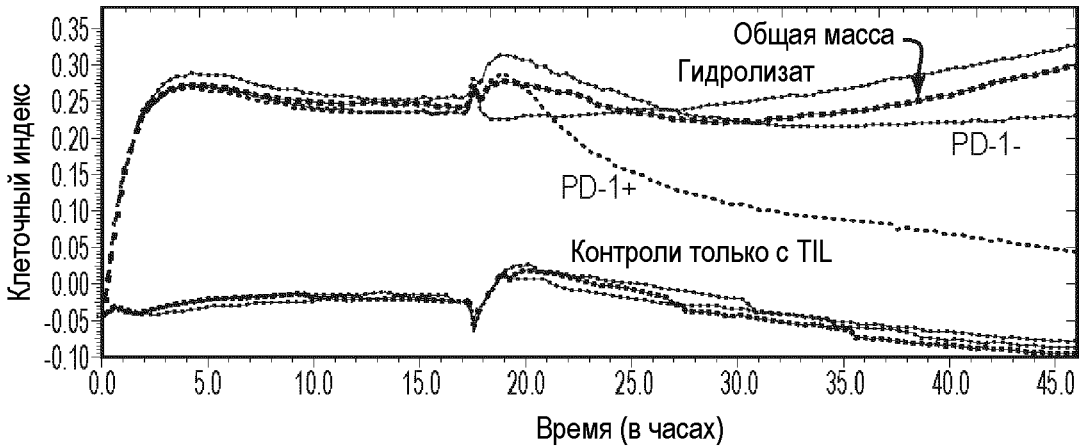
ФИГ. 79


Нестимулированные
Стимулированные (αCD3)
IFNγ (пг/мл)
60000
40000
20000
0
PD1⁺-производные TIL
PD1⁻-производные TIL
Общая масса TIL


PD1⁺-производные TIL
PD1⁻-производные TIL
Общая масса TIL
CD107a (кратность изменения)
100
80
60
40
20
0
CD4
CD8

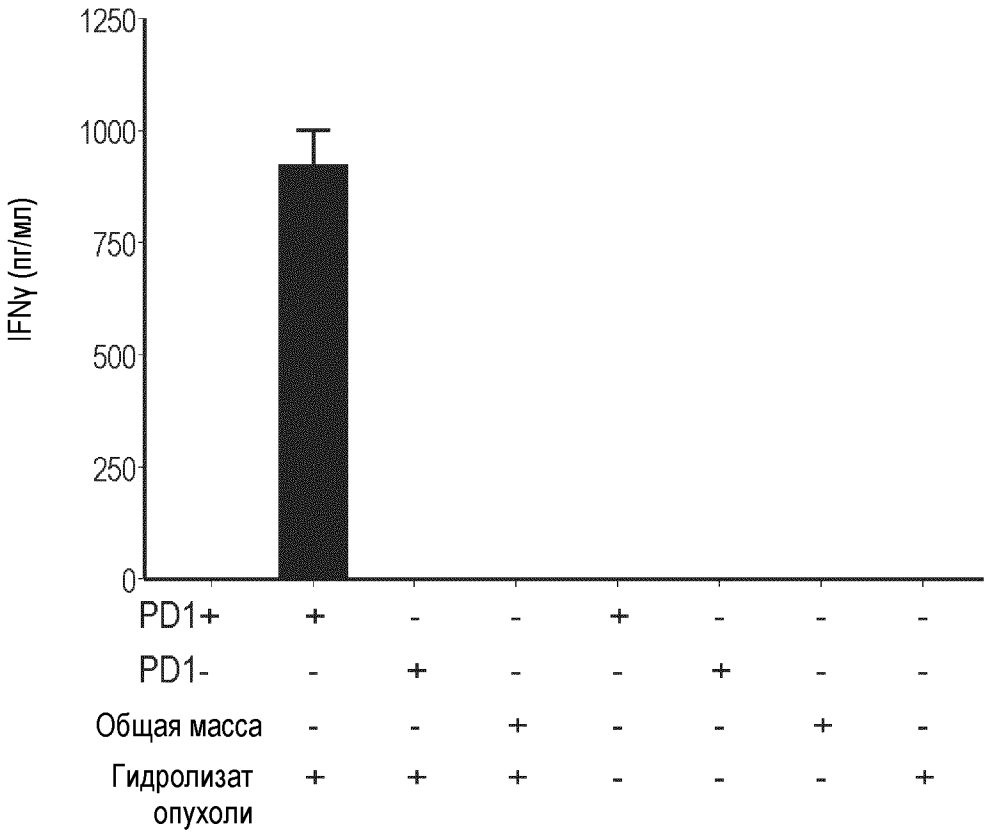
ФИГ. 80



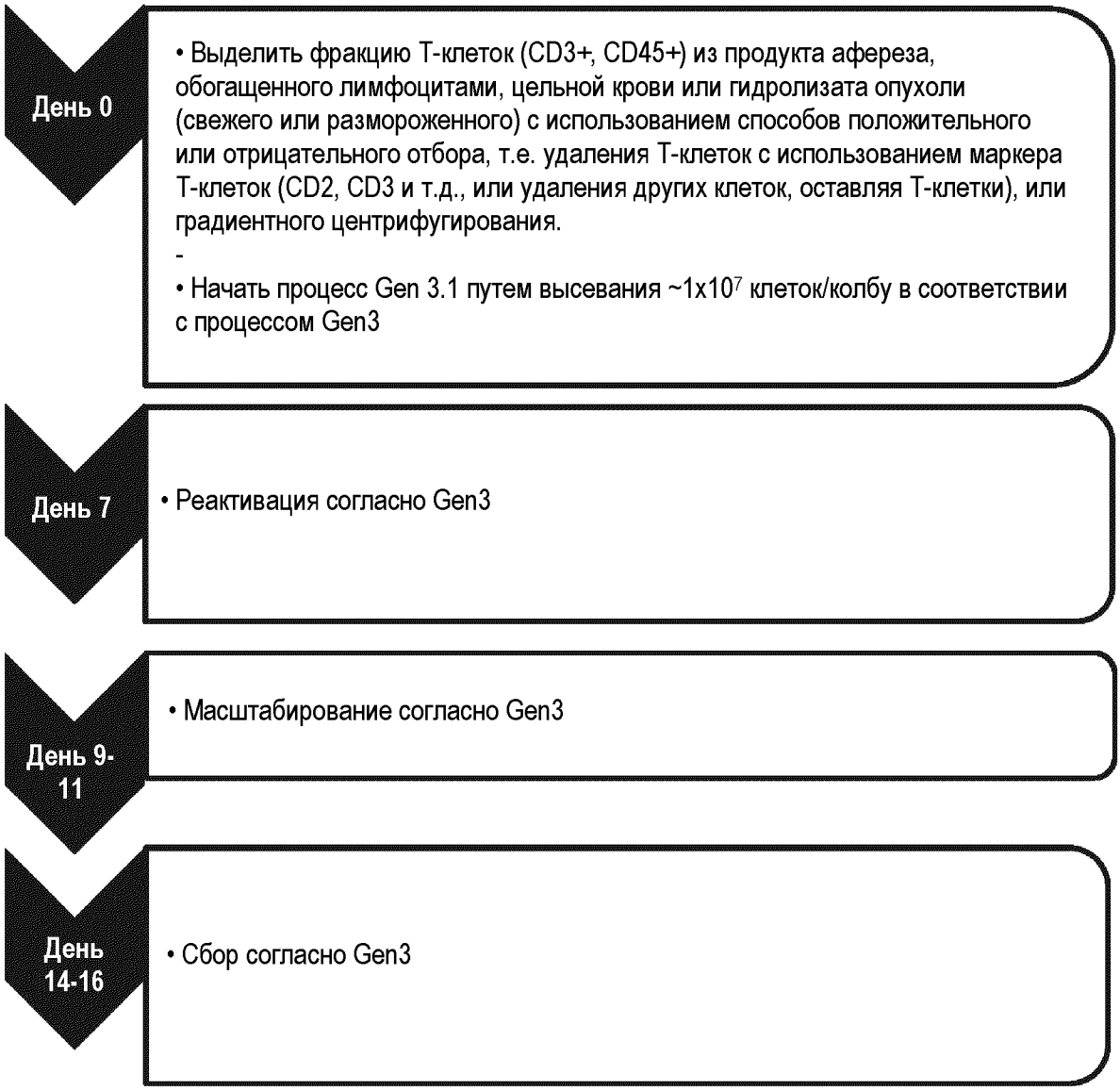


Система xCELLigence
ACEA Biosciences

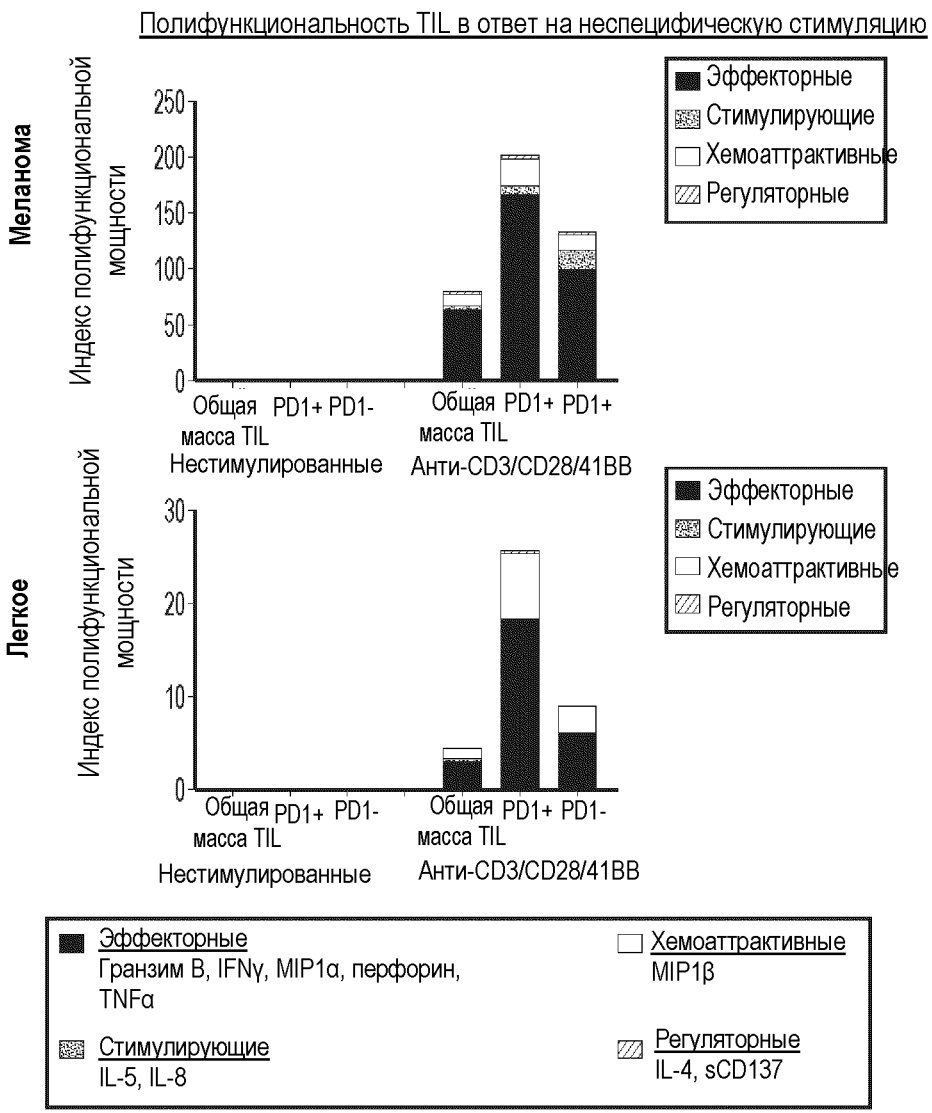
ФИГ. 81

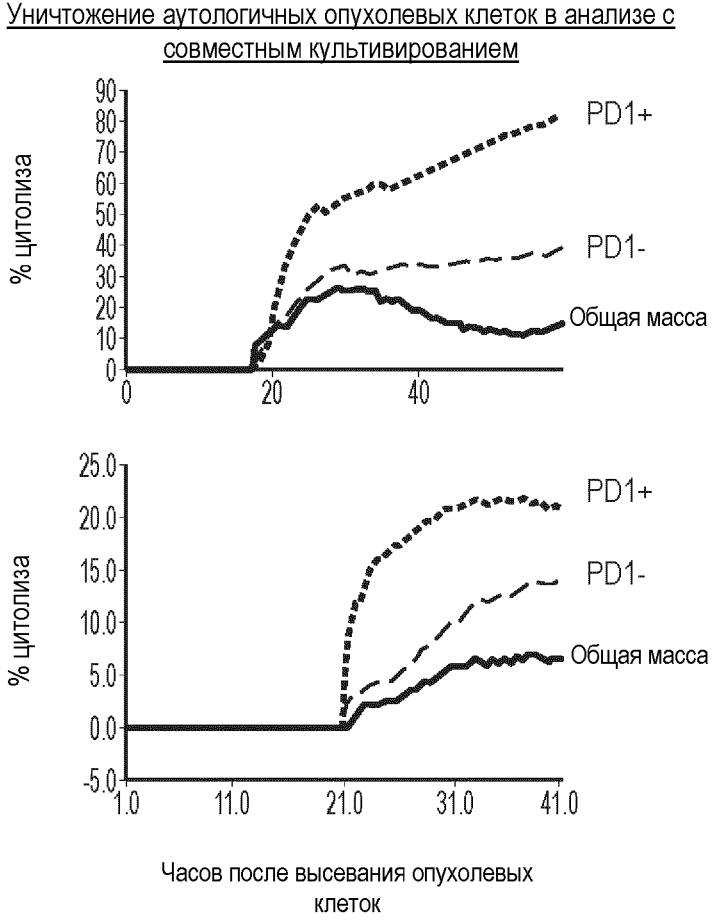

1250
1000
750
500
250
0
IFNγ (пг/мл)
PD1+ + - - + - - -
PD1- - + - - + - -
Общая масса - - + - - + -
Гидролизат опухоли + + + - - - +

ФИГ. 82

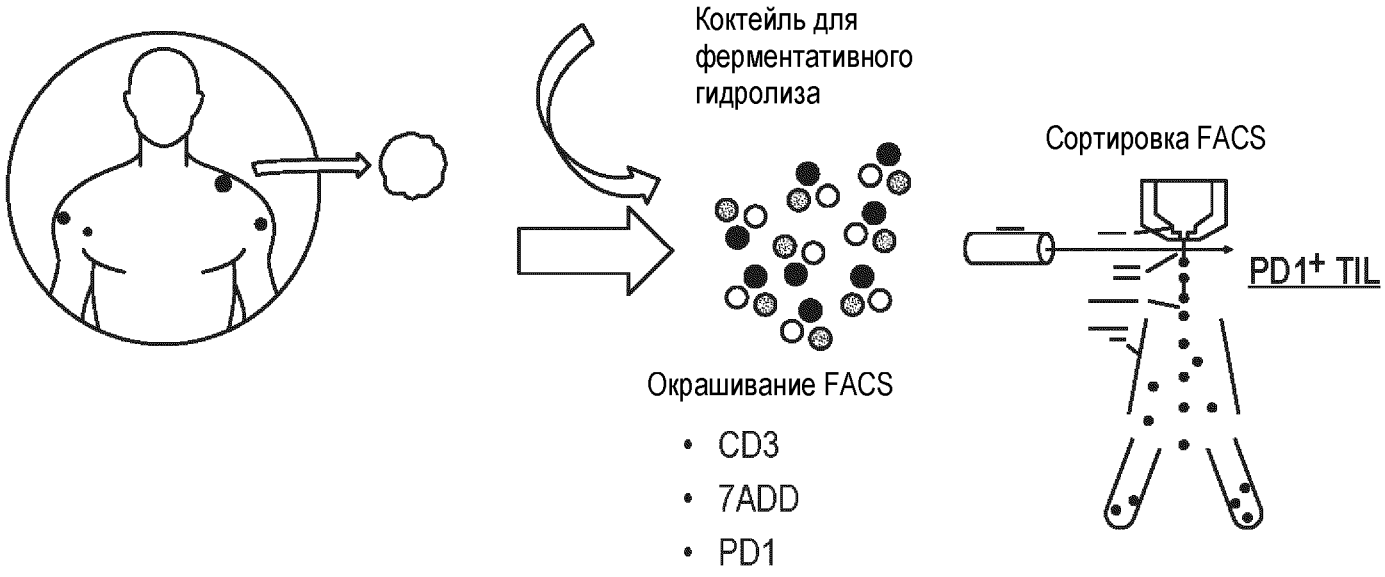

День 0
• Выделить фракцию Т-клеток (CD3+, CD45+) из продукта афереза, обогащенного лимфоцитами, цельной крови или гидролизата опухоли (свежего или размороженного) с использованием способов положительного или отрицательного отбора, т.е. удаления Т-клеток с использованием маркера Т-клеток (CD2, CD3 и т.д., или удаления других клеток, оставляя Т-клетки), или градиентного центрифугирования.
-
• Начать процесс Gen 3.1 путем высевания ~1x10^7 клеток/колбу в соответствии с процессом Gen3
День 7
• Реактивация согласно Gen3
День 9-11
• Масштабирование согласно Gen3
День 14-16
• Сбор согласно Gen3

ФИГ. 83


Полифункциональность TIL в ответ на неспецифическую стимуляцию
Меланома
Индекс полифункциональной мощности
250
200
150
100
50
0
Общая масса TIL
PD1+
PD1-
Нестимулированные
Анти-CD3/CD28/41BB
Эффекторные
Стимулирующие
Хемоаттрактивные
Регуляторные
Легкое
30
20
10
0
Эффекторные
Гранзим B, IFNγ, MIP1α, перфорин, TNFα
Хемоаттрактивные
MIP1β
Стимулирующие
IL-5, IL-8
Регуляторные
IL-4, sCD137


Уничтожение аутологичных опухолевых клеток в анализе с совместным культивированием
% цитолиза
PD1+
PD1-
Общая масса
Часов после высевания опухолевых клеток

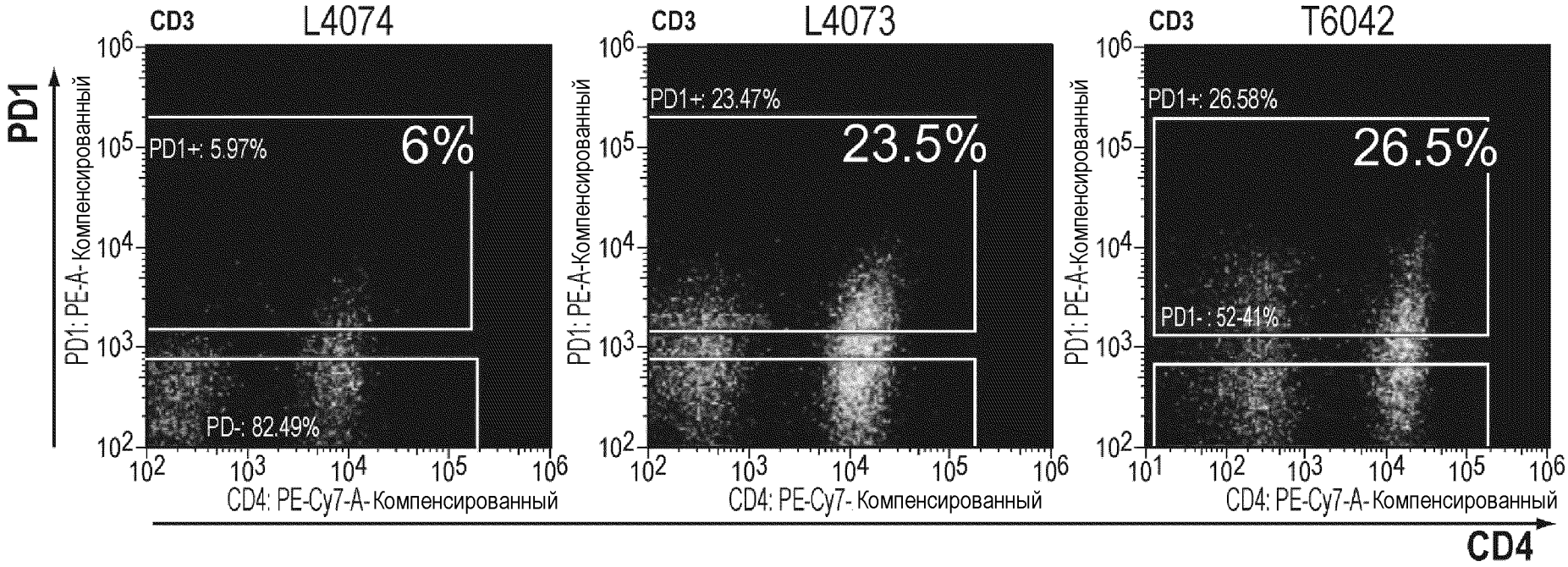
ФИГ. 84


Коктейль для ферментативного гидролиза
Сортировка FACS
PD1+ TIL
Окрашивание FACS
• CD3
• 7ADD
• PD1

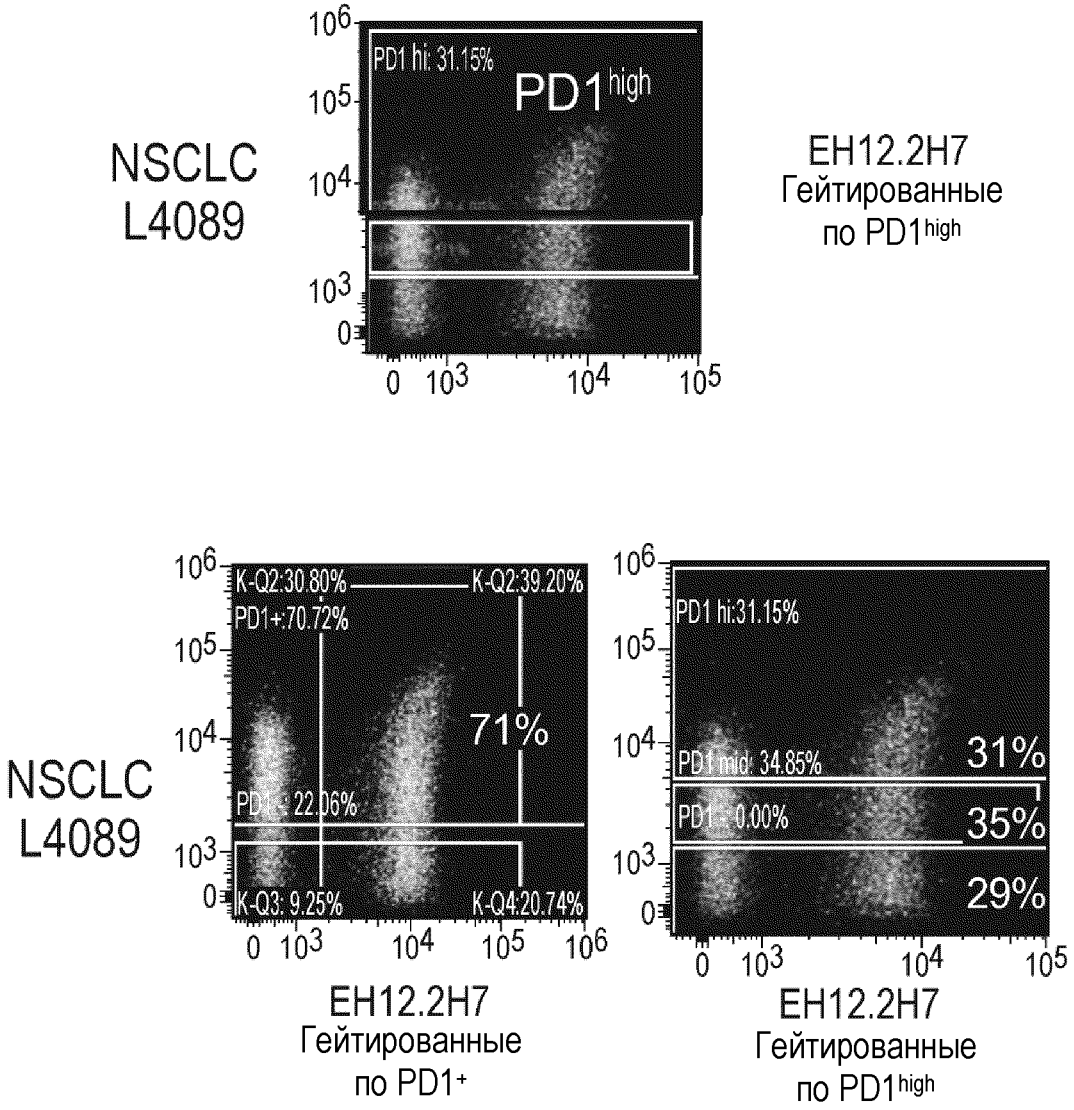
ФИГ. 85

	Клон αPD1	% PD1+ в гидролизате	Кол-во отсорт-х PD1+ клеток	Кратность экспансии [REP1; REP2]	Общий выход (экстраполированный)	Кол-во uCDR3	Энтро-пия	Общая доля (%) [общая масса; PD1+]
M1125	M1H4	***47.60%***	143,000	43; 303	(~2.5e8)	1281	3.6	29;36
M1126	M1H4	***0.78%***	3,000	5000; 948	(~14e9)	786	2.3	19.9; 71.9
M1129	M1H4	***13.90%***	13,393	1045; 1280	(~192e9)	18,234	7.4	38.1; 50.9
EP11040	M1H4	***33.50%***	5,693	228; 1260	(~14e9)	823	2.1	0.6; 78.9
EP11043	M1H4	***87%***	628,000	15; 1170	(~1.5e9)	1518	1.4	79.5; 88.6
L4067	M1H4	***58%***	115,000	300; 3600	(~108e9)	566	2.4	5.3; 35.2
L4068	M1H4	***4.60%***	32,500	73; 1170	(~27e9)	806	3.4	4.7; 34.6
L4073	M1H4	***27%***	88,426	1218; 20	(~2.2e9)	45,947	12.5	28.7; 39.5
L4074	M1H4	***6.70%***	8,384	324; 742	(~2e9)	1694	4.5	5.6; 72.2
L4075	M1H4	***13.50%***	11,000	53; 2152	(~2e8)	1416	4.1	17.9; 53.3
M1130	EH12.2H7	***59.50%***	529,000	230; 1670	(~203e9)	2815	6	5.7; 52.9
L4081	EH12.2H7	***78%***	390,000	2480; 1110	(~138e9)	5373	8.7	41.4; 65.5
L4082	EH12.2H7	***81.80%***	135,012	2120; 1990	(~396e9)	4467	6.4	57.8; 56.7
L4089	EH12.2H7	***75%***	826,000	46; 2491	(~950e9)	10093	9.9	58.9; 38.7
H3027	EH12.2H7	***92%***	71,929	31; 1470	(~3.17e9)	808	0.8	0.06; 0.03
L4093	***EH12.2H7***	***79%***	***448,000***	***1336, 483***	***~97e9***	***2886***	***5.7***	***18; 46***
M1135	***EH12.2H7***	***64%***	***48,000***	***5670, 497***	***~99e9***	***2371***	***5.5***	***4.8; 11.6***

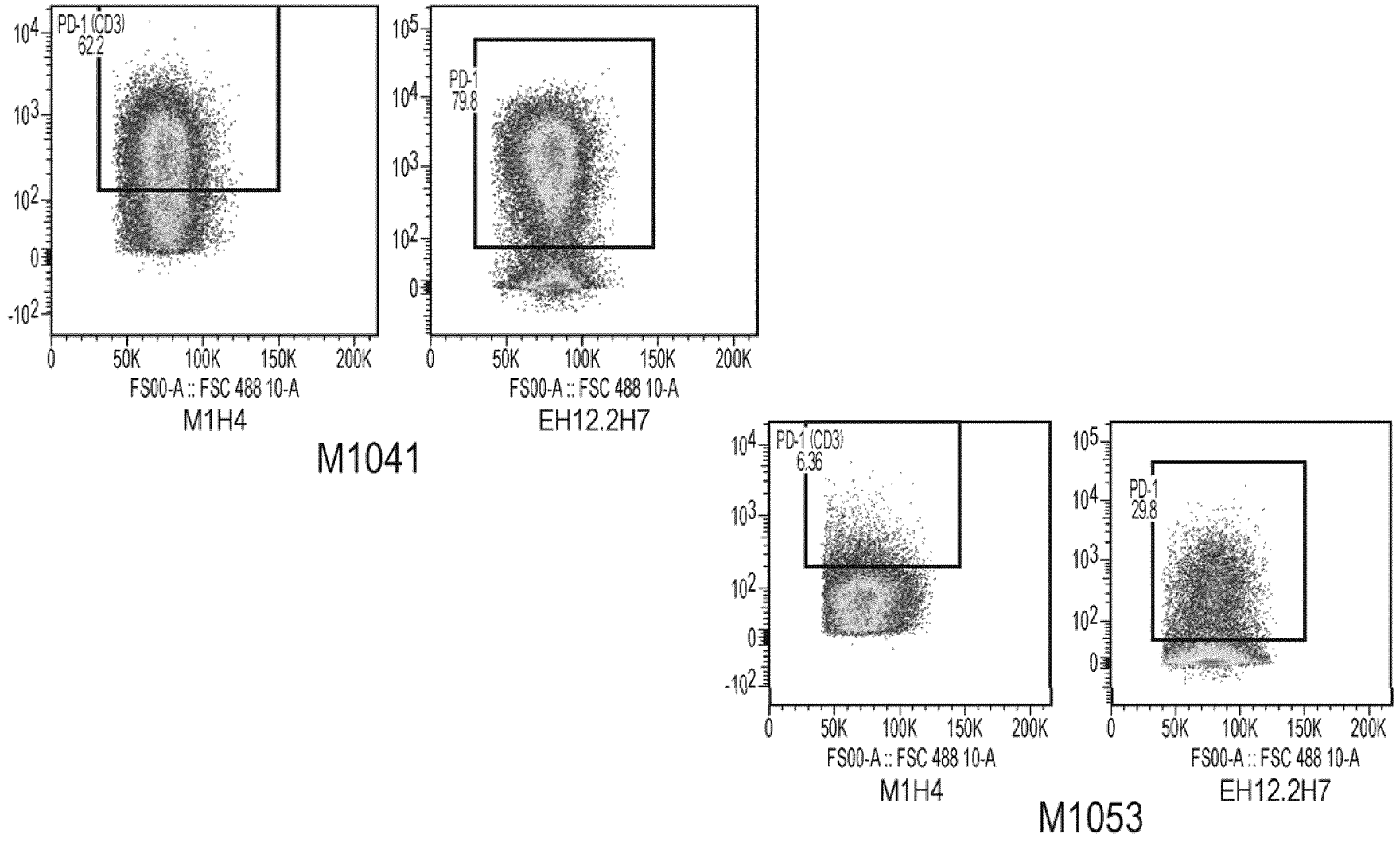
ФИГ. 86


CD3
L4074
PD1+: 5.97%
6%
PD-: 82.49%
CD3
L4073
PD1+: 23.47%
23.5%
CD3
T6042
PD1+: 26.58%
26.5%
PD1- : 52-41%
PD1: PE-A- Компенсированный
CD4: PE-Cy7-A- Компенсированный
PD1
CD4

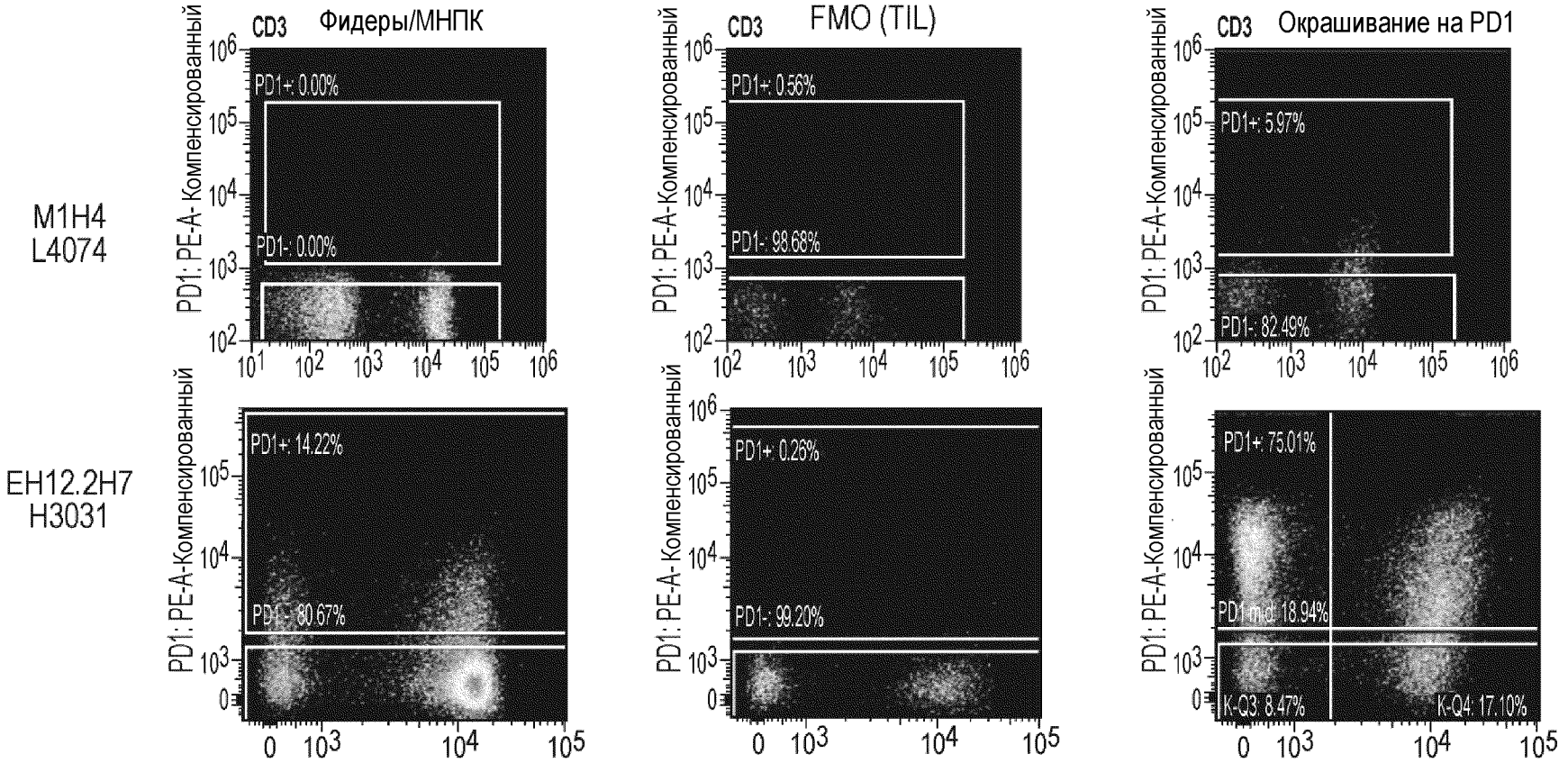
ФИГ. 87


NSCLC
L4089
PD1 hi: 31.15%
PD1 high
EH12.2H7
Гейтированные
по PD1high
NSCLC
L4089
K-Q2:30.80%
K-Q2:39.20%
PD1+:70.72%
71%
PD1-: 22.06%
K-Q3: 9.25%
K-Q4:20.74%
EH12.2H7
Гейтированные
по PD1+
PD1 hi:31.15%
PD1 mid: 34.85%
31%
PD1-: 0.00%
35%
29%
EH12.2H7
Гейтированные
по PD1high

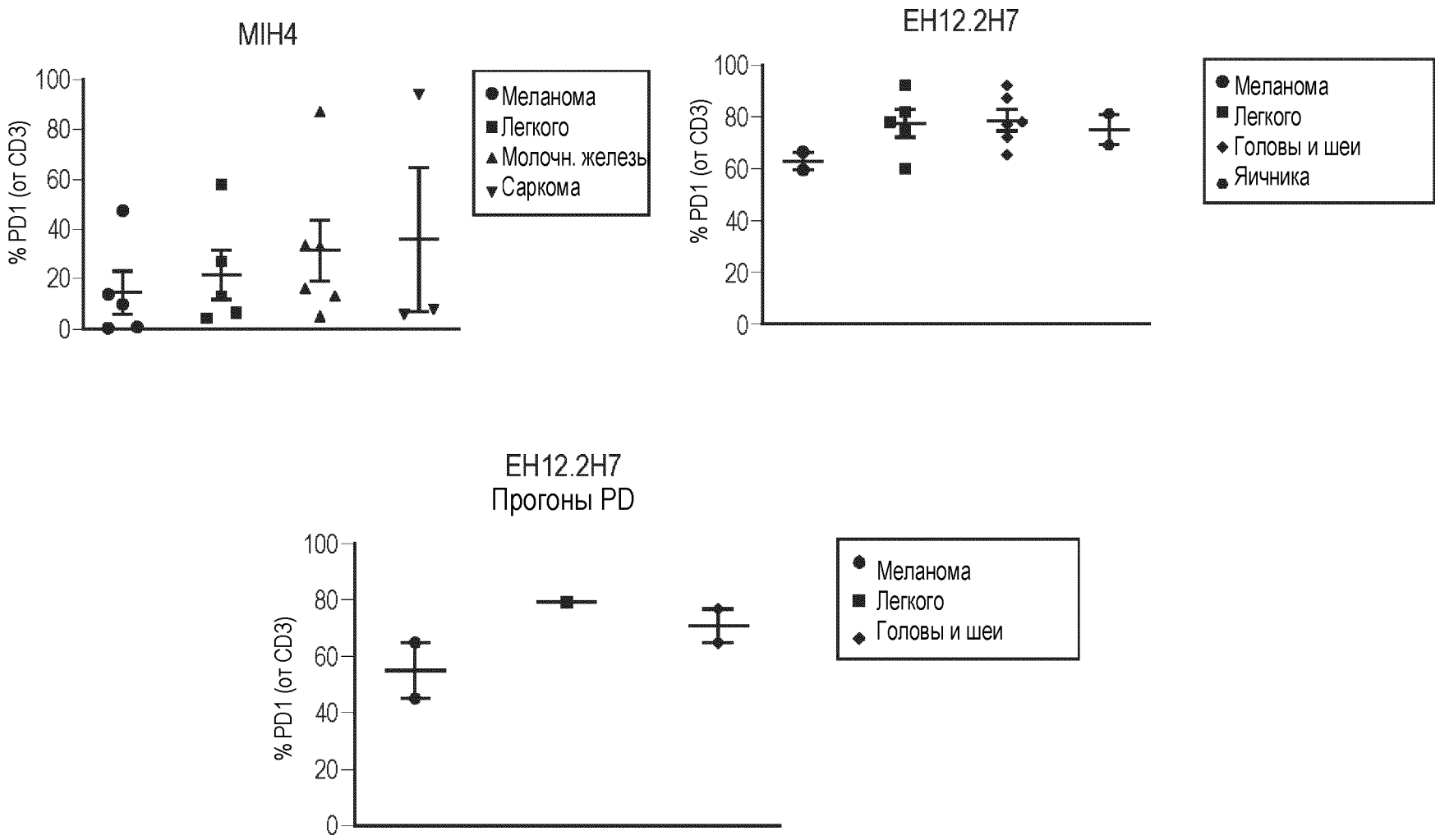
ФИГ. 88


PD-1 (CD3)
62.2
PD-1
79.8
FS00-A :: FSC 488 10-A
M1H4
EH12.2H7
M1041
PD-1 (CD3)
6.36
PD-1
29.8
FS00-A :: FSC 488 10-A
M1H4
EH12.2H7
M1053

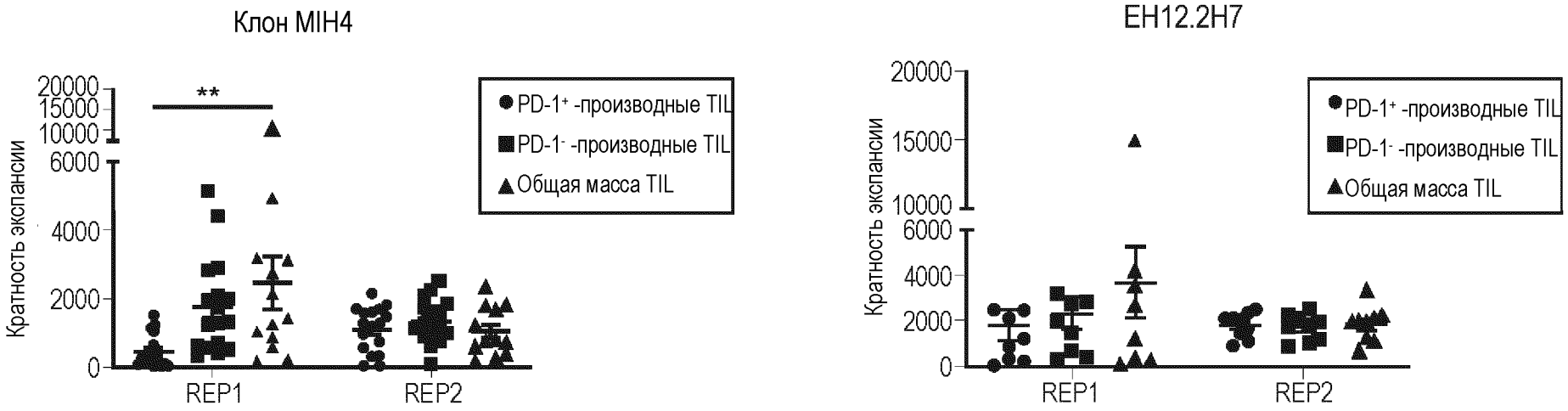
ФИГ. 89


M1H4
L4074
EH12.2H7
H3031
CD3
Фидеры/МНПК
FMO (TIL)
Окрашивание на PD1
PD1: PE-A-Компенсированный
PD1+: 0.00%
PD1-: 0.00%
PD1+: 0.56%
PD1-: 98.68%
PD1+: 5.97%
PD1-: 82.49%
PD1+: 14.22%
PD1-: 80.67%
PD1+: 0.26%
PD1-: 99.20%
PD1+: 75.01%
PD1 mid: 18.94%
K-Q3: 8.47%
K-Q4: 17.10%

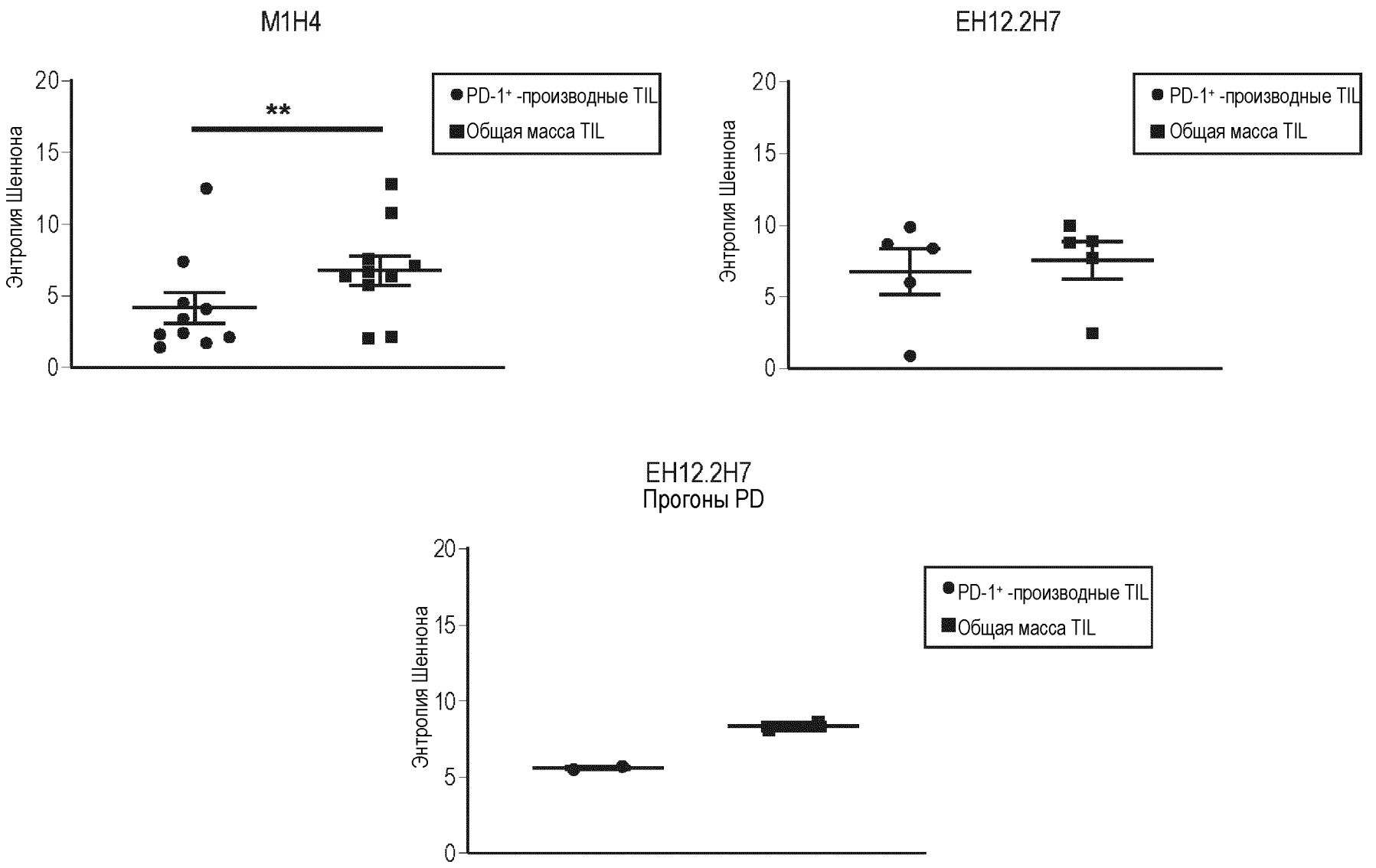
ФИГ. 90


MIH4
% PD1 (от CD3)
100
80
60
40
20
0
Меланома
Легкого
Молочн. железы
Саркома
EH12.2H7
% PD1 (от CD3)
100
80
60
40
20
0
Меланома
Легкого
Головы и шеи
Яичника
EH12.2H7
Прогоны PD
% PD1 (от CD3)
100
80
60
40
20
0
Меланома
Легкого
Головы и шеи

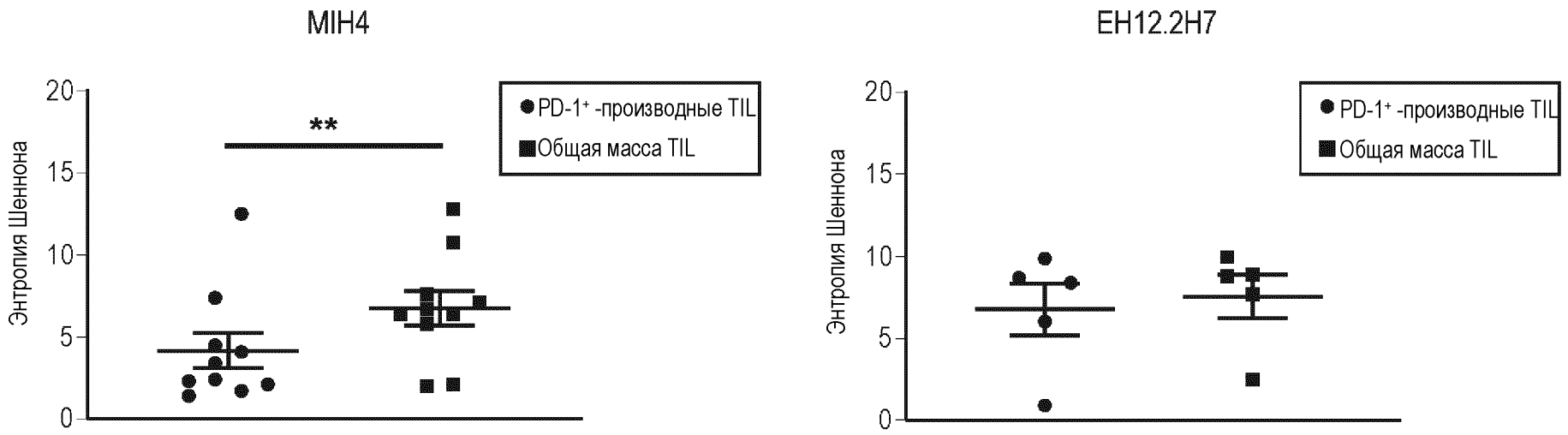
ФИГ. 91


Клон MIH4
EH12.2H7
Кратность экспансии
20000
15000
10000
6000
4000
2000
0
**
REP1
REP2
PD-1+ -производные TIL
PD-1- -производные TIL
Общая масса TIL

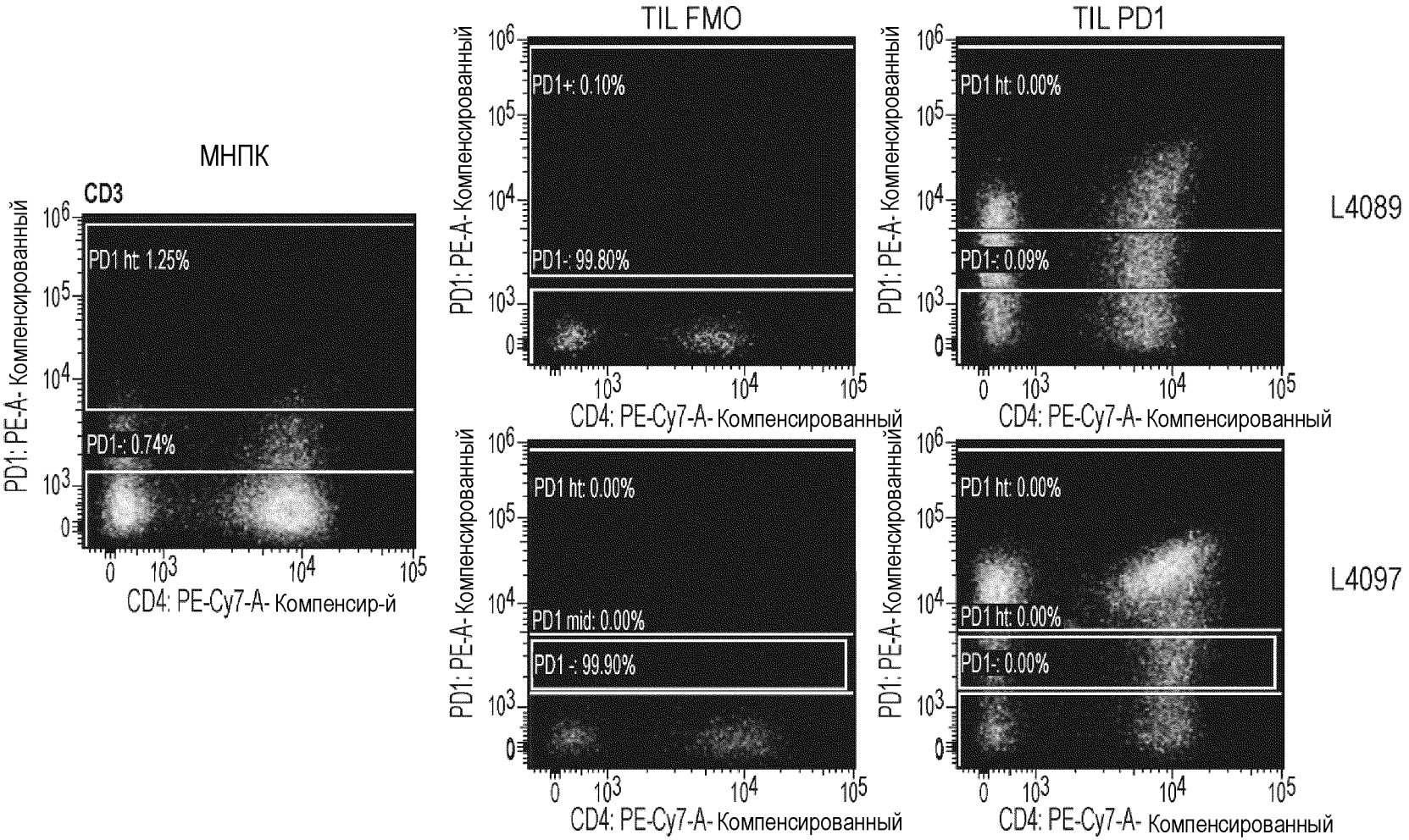
ФИГ. 92


M1H4
Энтропия Шеннона
20
15
10
5
0
**
PD-1+ -производные TIL
Общая масса TIL
EH12.2H7
Энтропия Шеннона
20
15
10
5
0
PD-1+ -производные TIL
Общая масса TIL
EH12.2H7
Прогоны PD
Энтропия Шеннона
20
15
10
5
0
PD-1+ -производные TIL
Общая масса TIL

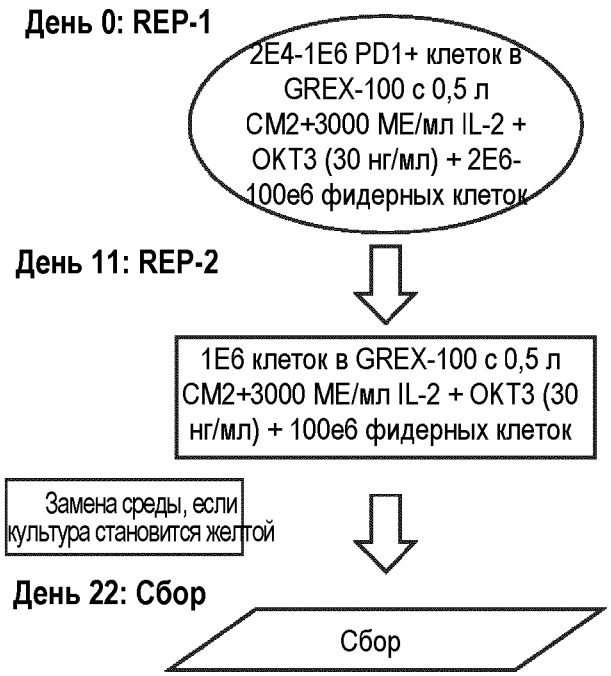
ФИГ. 93

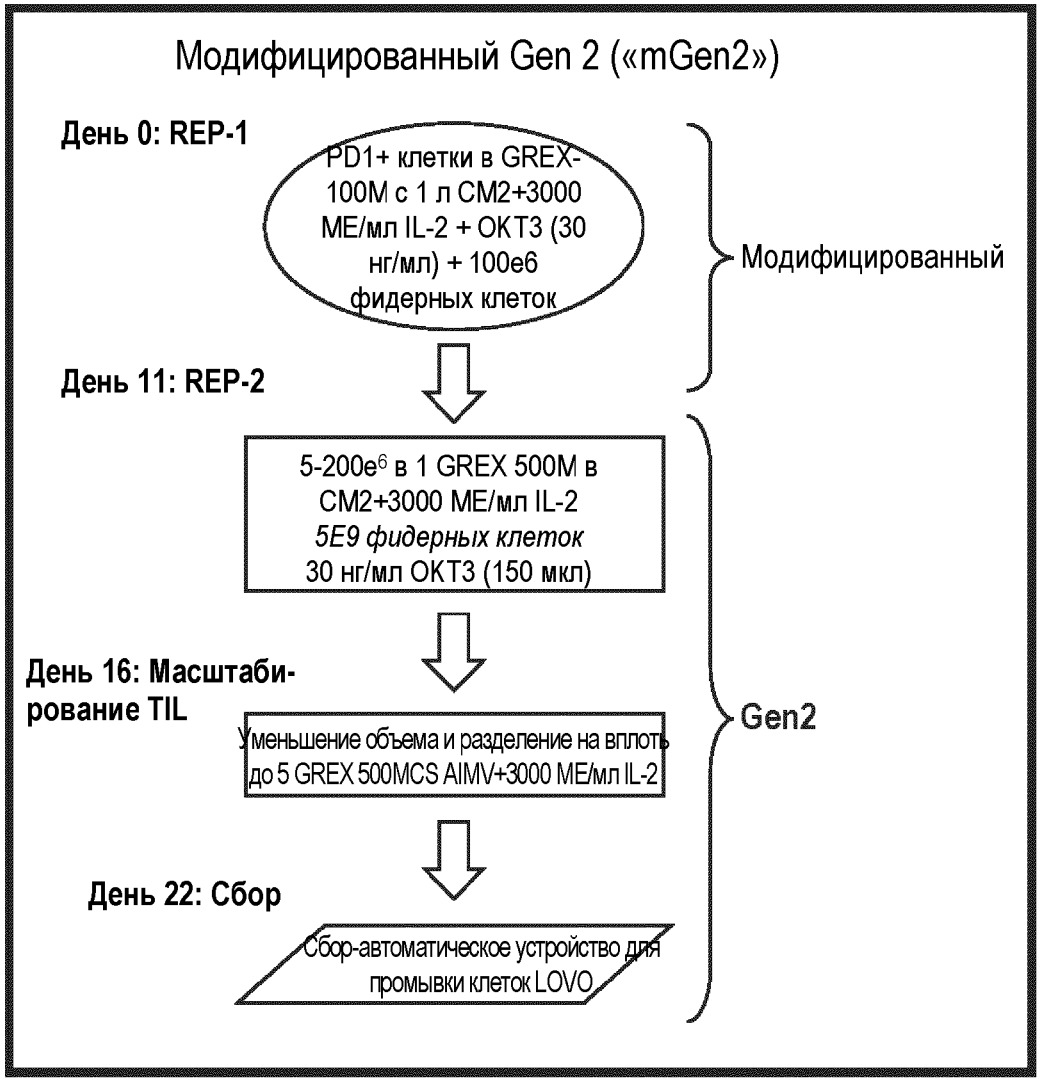

MIH4
EH12.2H7
Энтропия Шеннона
20
15
10
5
0
**
PD-1+ -производные TIL
Общая масса TIL

ФИГ. 94

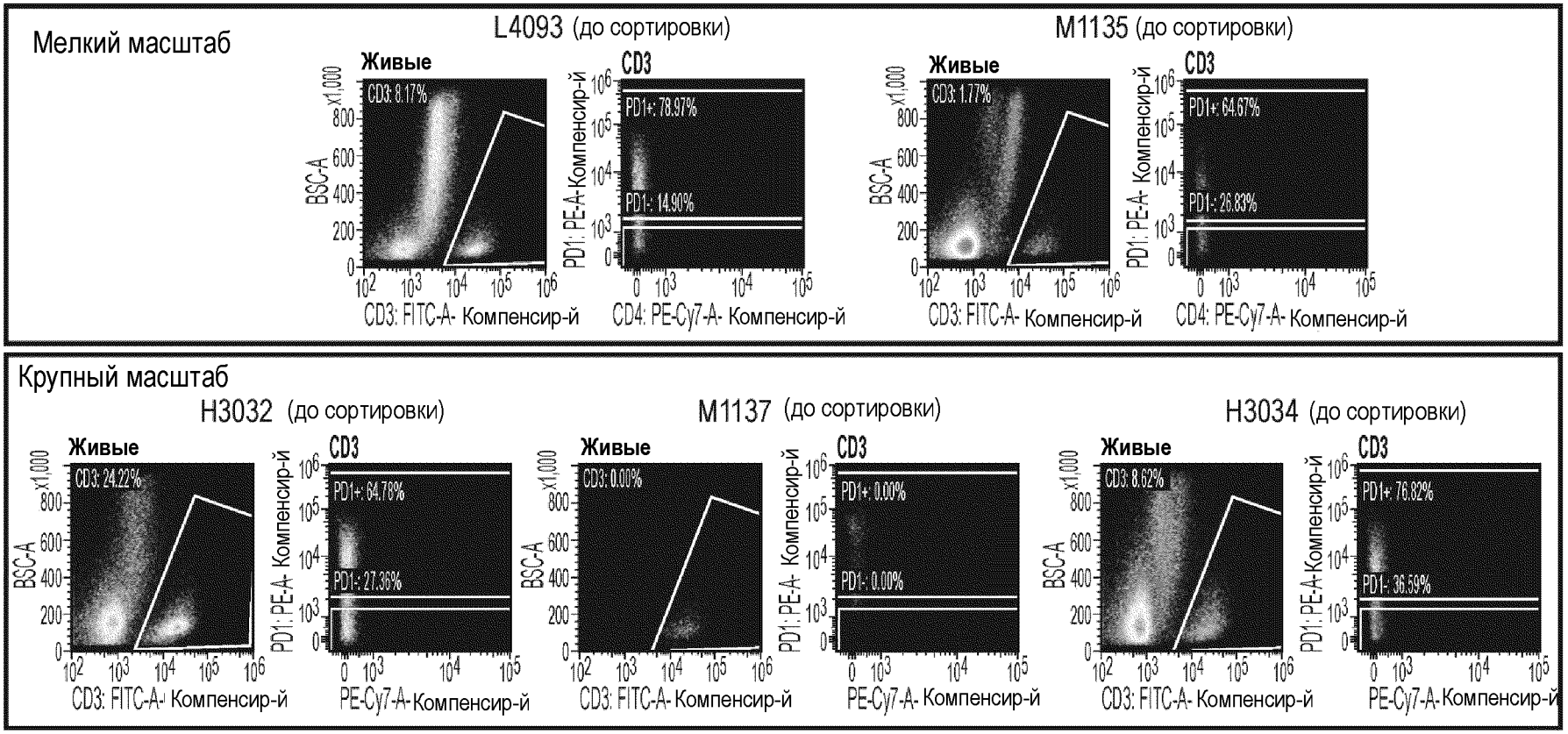

МНПК
CD3
PD1 ht: 1.25%
PD1-: 0.74%
PD1: PE-A- Компенсированный
CD4: PE-Cy7-A- Компенсир-й
TIL FMO
PD1+: 0.10%
PD1-: 99.80%
PD1 ht: 0.00%
PD1 mid: 0.00%
PD1 -: 99.90%
TIL PD1
PD1 ht: 0.00%
PD1-: 0.09%
L4089
PD1 ht: 0.00%
PD1 ht: 0.00%
PD1-: 0.00%
L4097
CD4: PE-Cy7-A- Компенсированный

ФИГ. 95

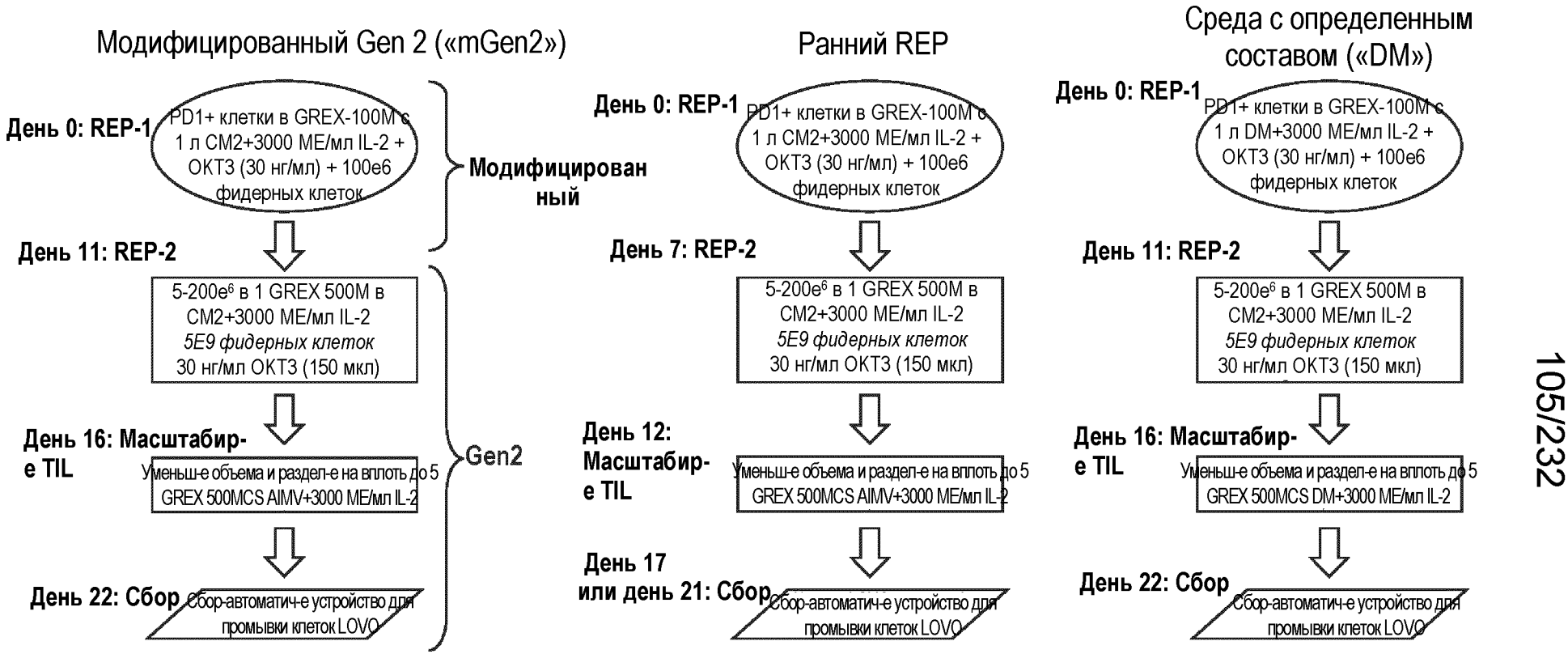

День 0: REP-1
2E4-1E6 PD1+ клеток в GREX-100 с 0,5 л CM2+3000 МЕ/мл IL-2 + OKT3 (30 нг/мл) + 2E6-100e6 фидерных клеток
День 11: REP-2
1E6 клеток в GREX-100 с 0,5 л CM2+3000 МЕ/мл IL-2 + OKT3 (30 нг/мл) + 100e6 фидерных клеток
Замена среды, если культура становится желтой
День 22: Сбор
Сбор


Модифицированный Gen 2 («mGen2»)
День 0: REP-1
PD1+ клетки в GREX-100M с 1 л CM2+3000 МЕ/мл IL-2 + OKT3 (30 нг/мл) + 100e6 фидерных клеток
Модифицированный
День 11: REP-2
5-200e6 в 1 GREX 500M в CM2+3000 МЕ/мл IL-2
5E9 фидерных клеток
30 нг/мл OKT3 (150 мкл)
День 16: Масштаби-рование TIL
Уменьшение объема и разделение на вплоть до 5 GREX 500MCS AIMV+3000 МЕ/мл IL-2
День 22: Сбор
Сбор-автоматическое устройство для промывки клеток LOVO
Gen2

ФИГ. 96


Мелкий масштаб
L4093 (до сортировки)
Живые
CD3: 8.17%
BSC-A
x1,000
CD3: FITC-A- Компенсир-й
CD3
PD1+: 78.97%
PD1-: 14.90%
PD1: PE-A- Компенсир-й
CD4: PE-Cy7-A- Компенсир-й
M1135 (до сортировки)
Живые
CD3: 1.77%
CD3
PD1+: 64.67%
PD1-: 26.83%
Крупный масштаб
H3032 (до сортировки)
Живые
CD3: 24.22%
CD3
PD1+: 64.78%
PD1-: 27.36%
PE-Cy7-A- Компенсир-й
M1137 (до сортировки)
Живые
CD3: 0.00%
CD3
PD1+: 0.00%
PD1-: 0.00%
H3034 (до сортировки)
Живые
CD3: 8.62%
CD3
PD1+: 76.82%
PD1-: 36.59%

ФИГ. 97


Модифицированный Gen 2 («mGen2»)
Ранний REP
Среда с определенным составом («DM»)
День 0: REP-1
PD1+ клетки в GREX-100M с 1 л CM2+3000 ME/мл IL-2 + OKT3 (30 нг/мл) + 100e6 фидерных клеток
Модифицированный
День 11: REP-2
5-200e6 в 1 GREX 500M в CM2+3000 ME/мл IL-2 5E9 фидерных клеток 30 нг/мл OKT3 (150 мкл)
День 16: Масштабир-е TIL
Уменьш-е объема и раздел-е на вплоть до 5 GREX 500MCS AIMV+3000 ME/мл IL-2
Gen2
День 22: Сбор
Сбор-автоматич-е устройство для промывки клеток LOVO
День 0: REP-1
PD1+ клетки в GREX-100M с 1 л CM2+3000 ME/мл IL-2 + OKT3 (30 нг/мл) + 100e6 фидерных клеток
День 7: REP-2
5-200e6 в 1 GREX 500M в CM2+3000 ME/мл IL-2 5E9 фидерных клеток 30 нг/мл OKT3 (150 мкл)
День 12: Масштабир-е TIL
Уменьш-е объема и раздел-е на вплоть до 5 GREX 500MCS AIMV+3000 ME/мл IL-2
День 17 или день 21: Сбор
Сбор-автоматич-е устройство для промывки клеток LOVO
День 0: REP-1
PD1+ клетки в GREX-100M с 1 л DM+3000 ME/мл IL-2 + OKT3 (30 нг/мл) + 100e6 фидерных клеток
День 11: REP-2
5-200e6 в 1 GREX 500M в CM2+3000 ME/мл IL-2 5E9 фидерных клеток 30 нг/мл OKT3 (150 мкл)
День 16: Масштабир-е TIL
Уменьш-е объема и раздел-е на вплоть до 5 GREX 500MCS DM+3000 ME/мл IL-2
День 22: Сбор
Сбор-автоматич-е устройство для промывки клеток LOVO

ФИГ. 98

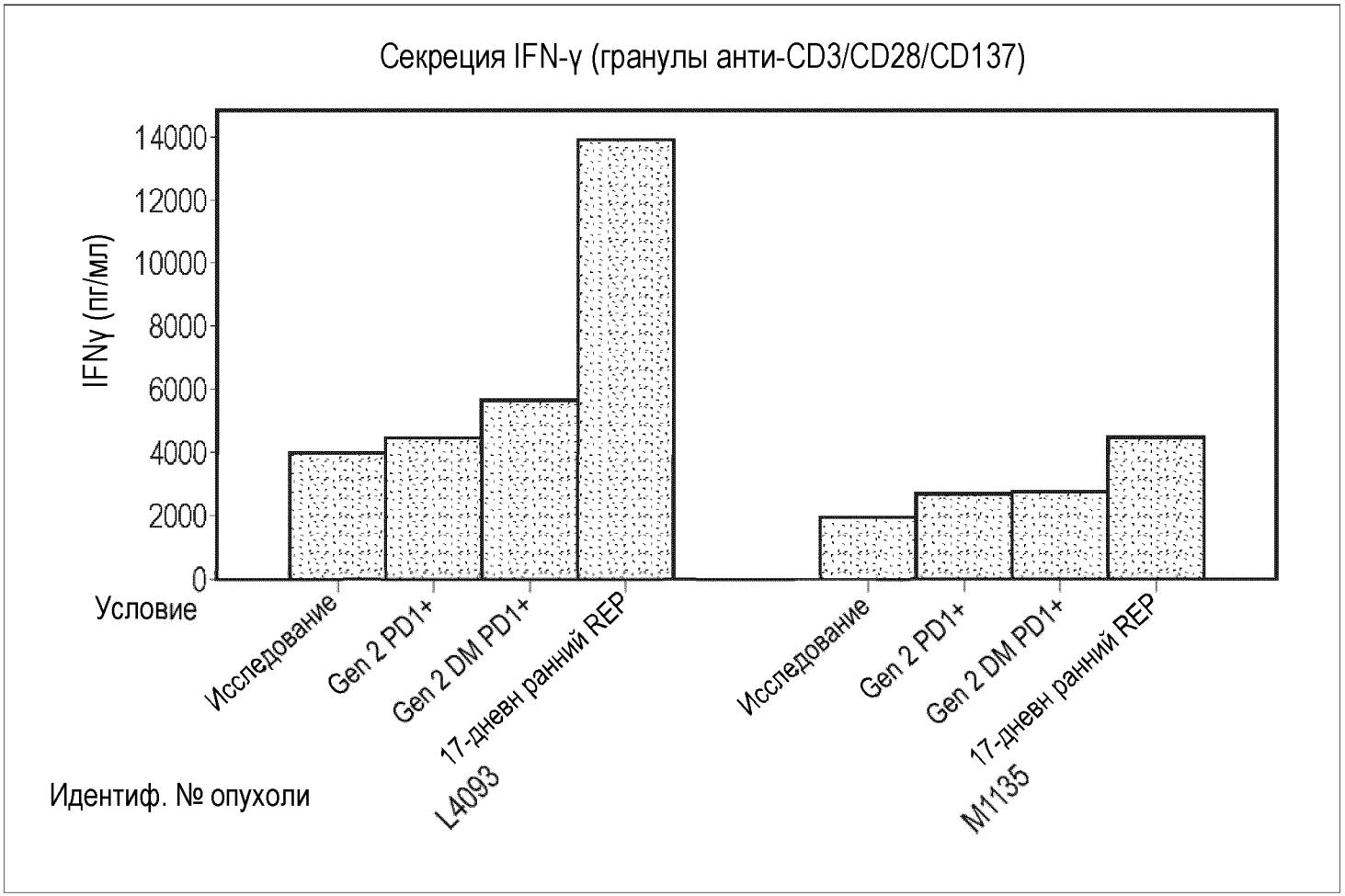
	Легкое (L4093)				Меланома (M1135)			
Сводные данные проточн. сортировки								
# до сортировки (%CD3+PD1+)	5.6e5 (6.5%)				4.88 e4 (1.2%)			
# отсортированных (% выход)	4.5e5 (80.7%)				4.8e4 (98.4)			
*Чистота после сортировки (%)	85%				75.7%			
Сводные данные экспансии TIL	**Исследование** ***PD1+***	***Gen 2 PD1+***	***Gen 2 DM PD1+***	***^ER PD1+***	**Исследование** ***PD1+***	***Gen 2 PD1+***	***Gen 2 DM PD1+***	***^ER PD1+***
# высеянных REP1 (G-Rex100/100M)	4.48e5	4.48e5	4.48e5	4.48e5	4.8e4	4.8e4	4.8e4	4.8e4
# собранных REP1 (экстраполировано)	599e6	560e6	225e6	44e6	34e6	272e6	256e6	46e6
Кратность экспансии REP1	1336	1249	503	99	705	5670	5334	958
# высеянных REP2 (G-Rex100/500M)	1e6	200e6	200e6	44e6	1e6	200e6	200e6	44e6
# собранных REP2 (экстраполировано)	24e9	97e9	64e9	55e9	4.3e9	99e9	97e9	37e9
Кратность экспансии REP2	404	483	318	247	1282	497	483	270

- общее количество жизнеспособных клеток (TVC)

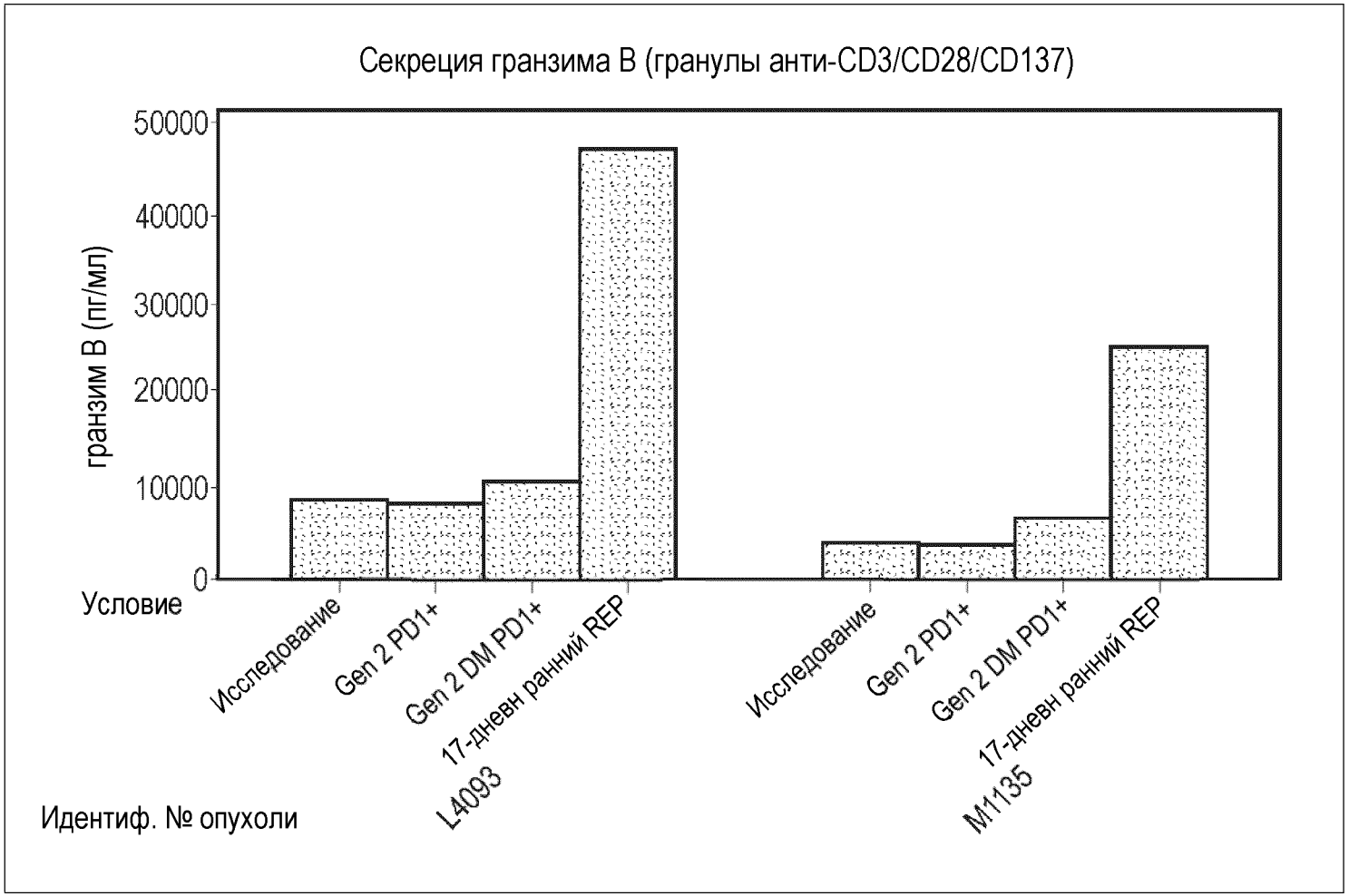
* - чистота была основана на FSC/CD3+/PD1+, но не на жизнеспособных клетках

^ – REP1 в день 7, REP2 в день 17

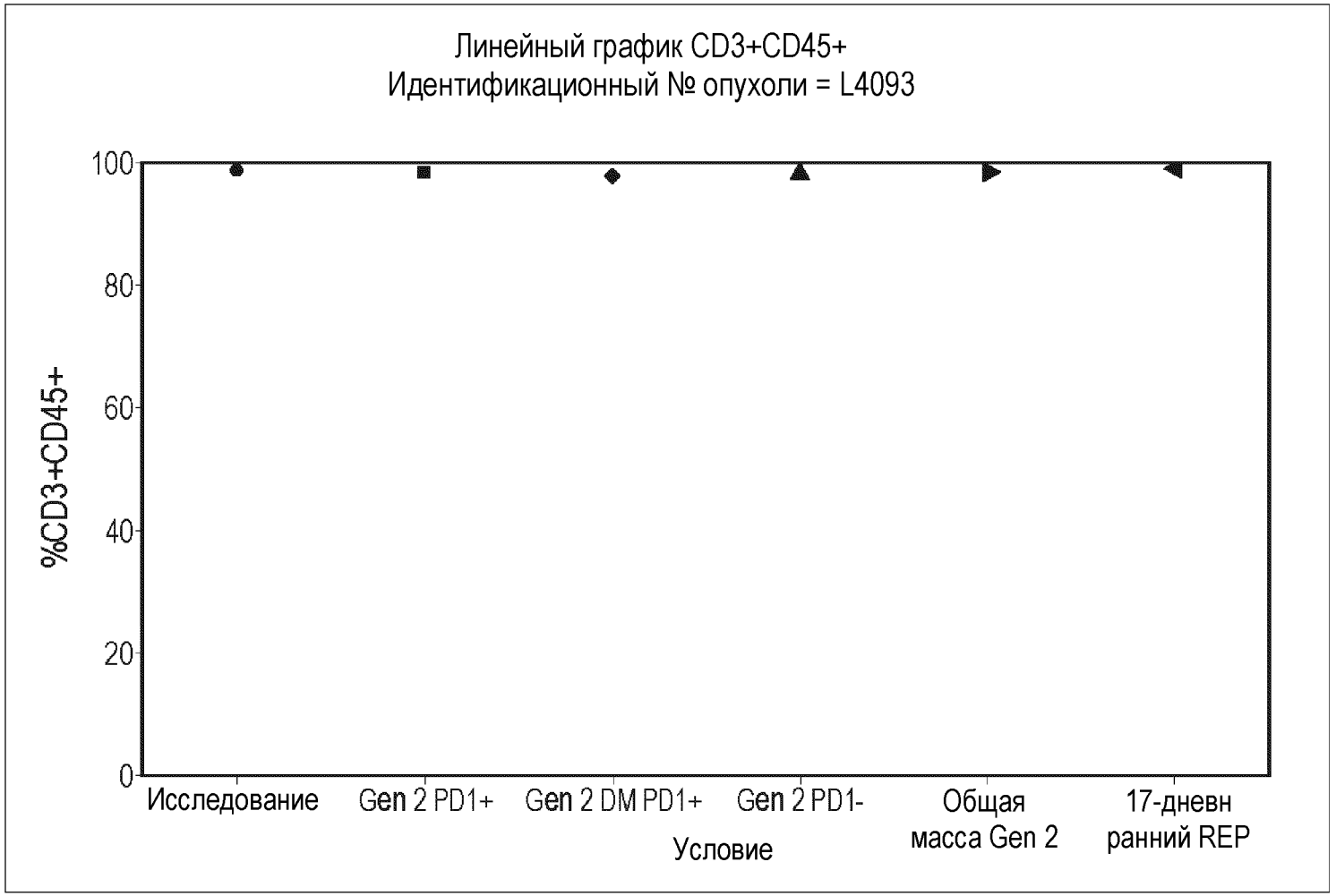
ФИГ. 99


Секреция IFN-γ (гранулы анти-CD3/CD28/CD137)
IFNγ (пг/мл)
14000
12000
10000
8000
6000
4000
2000
0
Условие
Исследование
Gen 2 PD1+
Gen 2 DM PD1+
17-дневн ранний REP
Исследование
Gen 2 PD1+
Gen 2 DM PD1+
17-дневн ранний REP
Идентиф. № опухоли
L4093
M1135

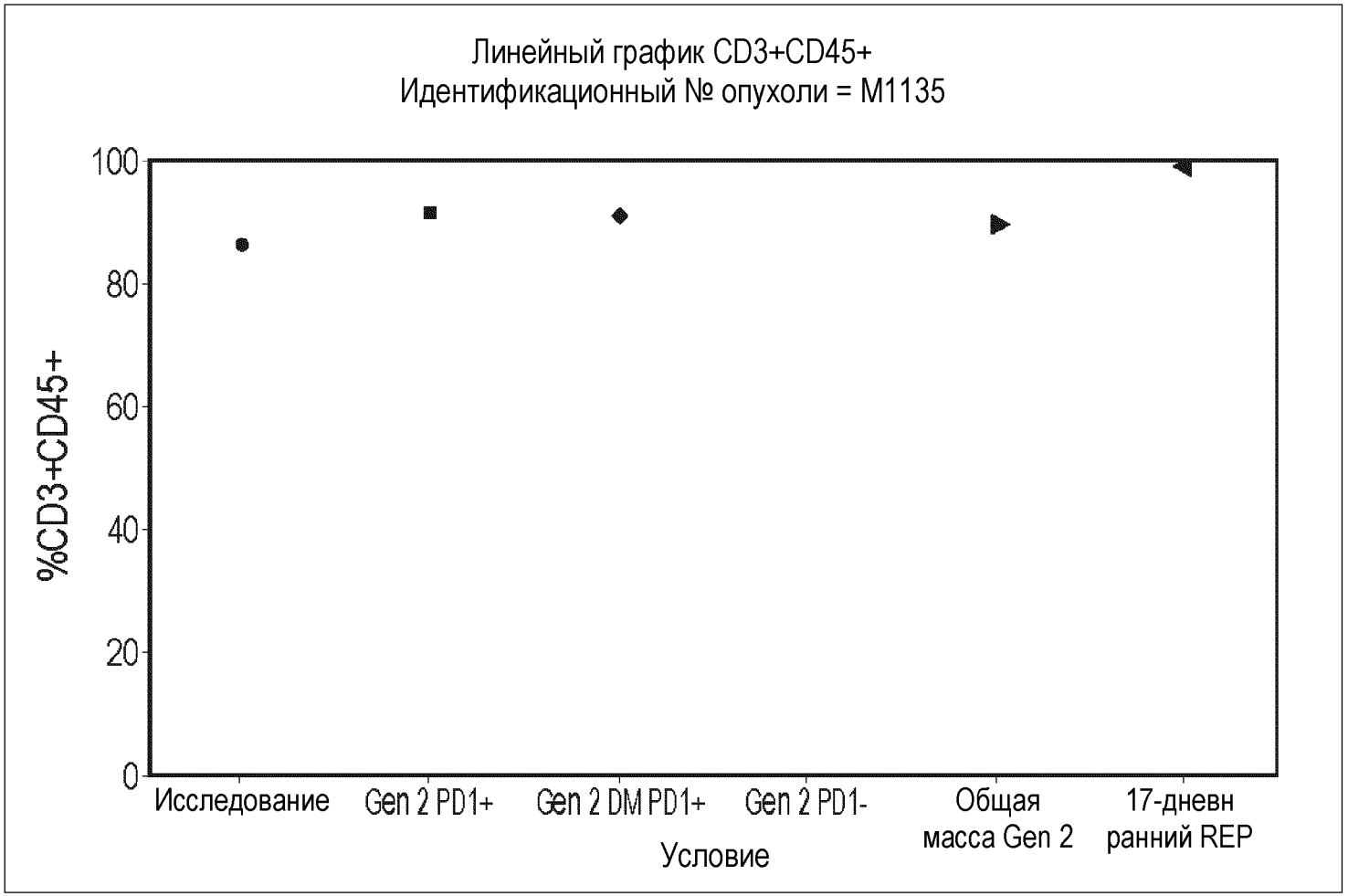
ФИГ. 100


Секреция гранзима B (гранулы анти-CD3/CD28/CD137)
гранзим B (пг/мл)
50000
40000
30000
20000
10000
0
Условие
Исследование
Gen 2 PD1+
Gen 2 DM PD1+
17-дневн ранний REP
Исследование
Gen 2 PD1+
Gen 2 DM PD1+
17-дневн ранний REP
Идентиф. № опухоли
L4093
M1135

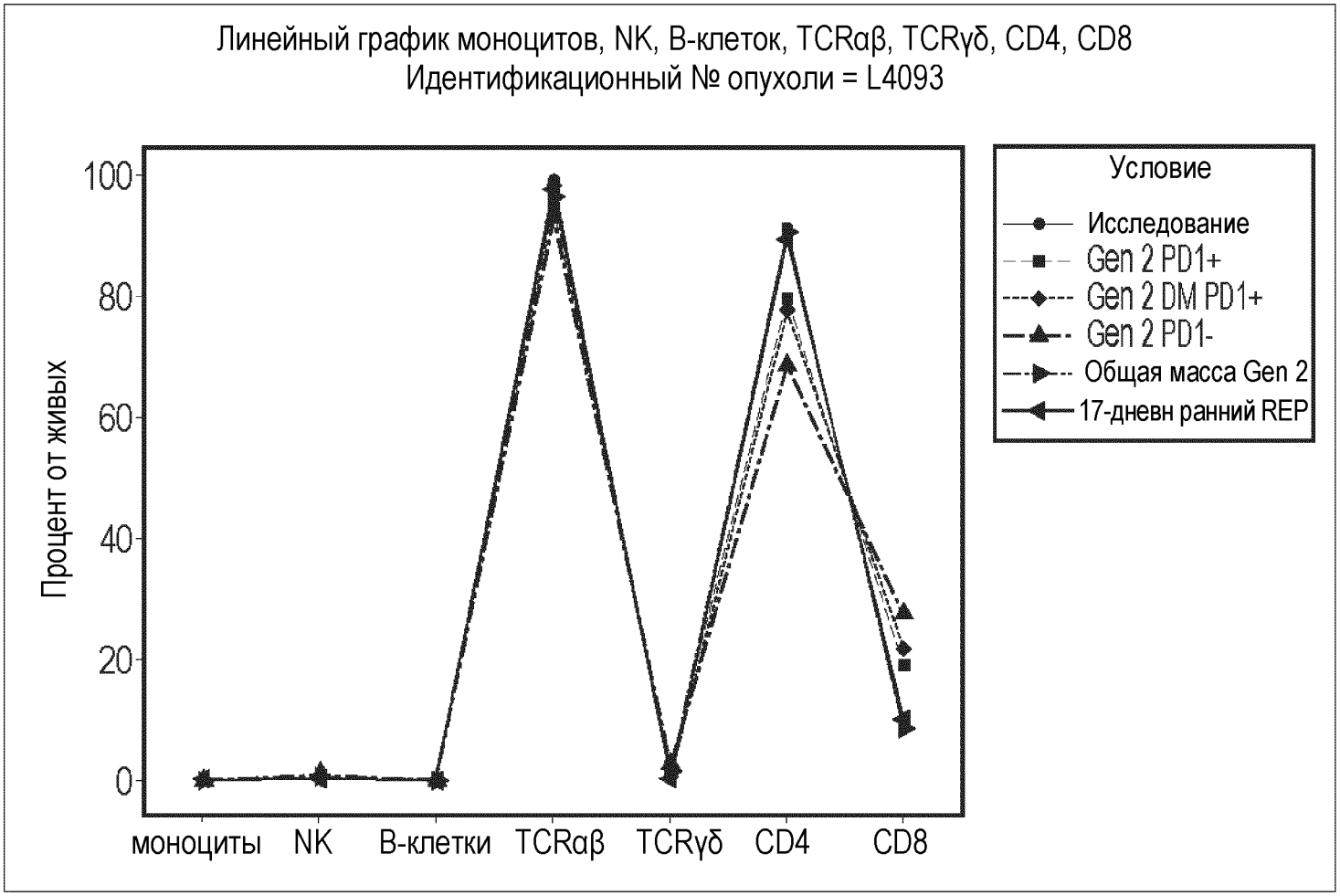
ФИГ. 101


Линейный график CD3+CD45+
Идентификационный № опухоли = L4093
100
80
60
40
20
0
%CD3+CD45+
Исследование
Gen 2 PD1+
Gen 2 DM PD1+
Gen 2 PD1-
Общая масса Gen 2
17-дневн ранний REP
Условие

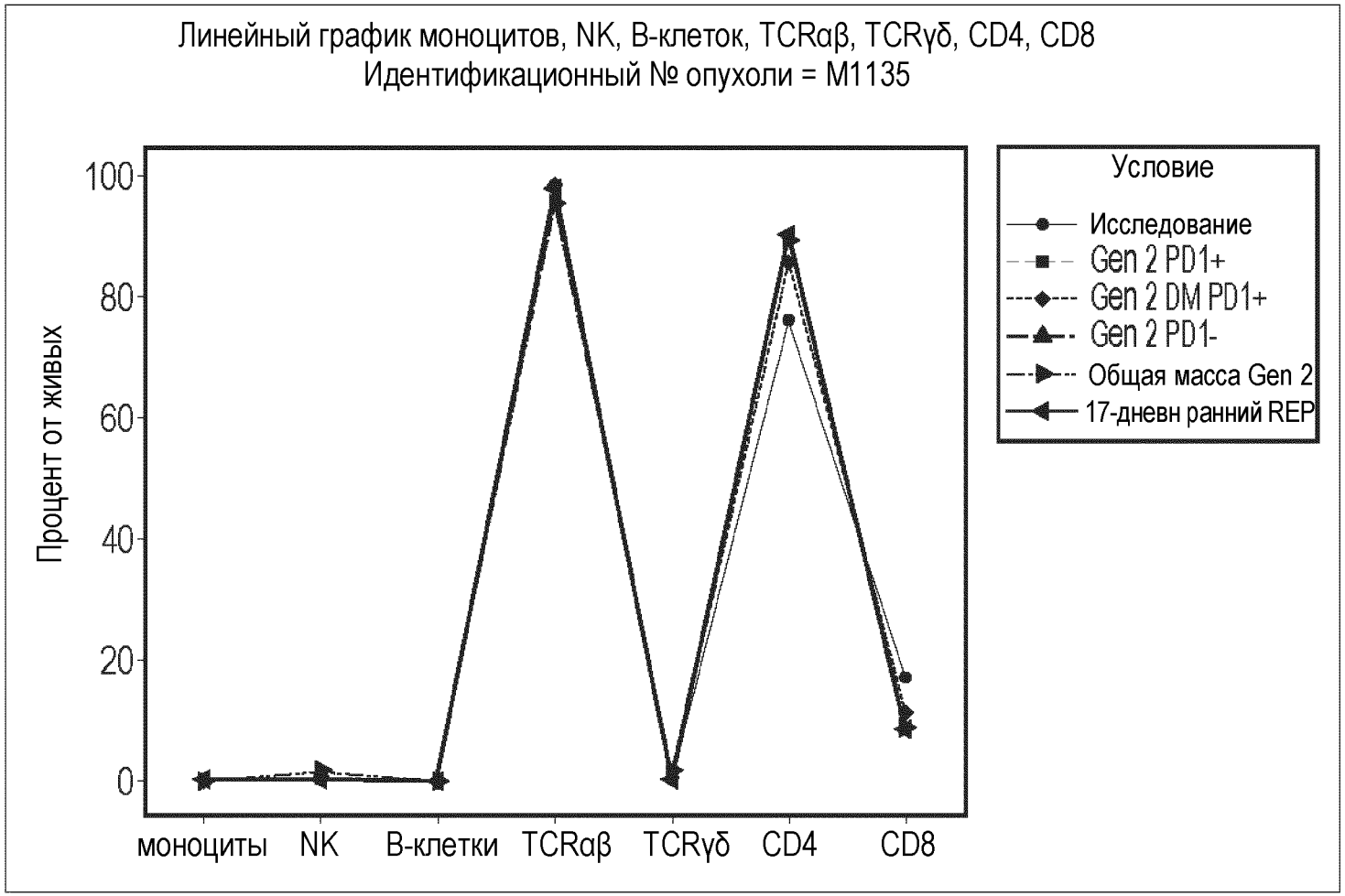
ФИГ. 102


Линейный график CD3+CD45+
Идентификационный № опухоли = M1135
%CD3+CD45+
100
80
60
40
20
0
Исследование
Gen 2 PD1+
Gen 2 DM PD1+
Gen 2 PD1-
Общая масса Gen 2
17-дневн ранний REP
Условие

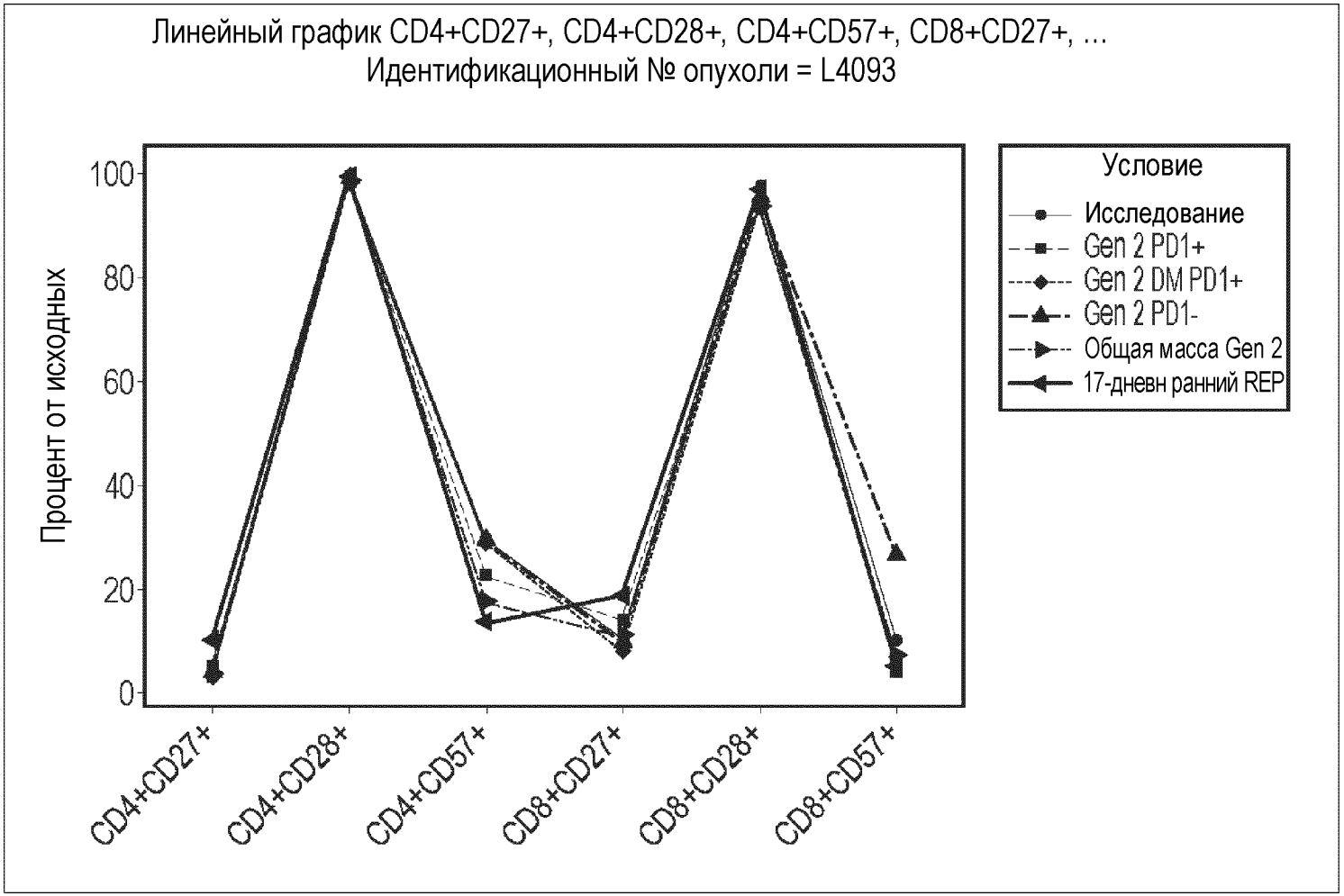
ФИГ. 103


Линейный график моноцитов, NK, B-клеток, TCRαβ, TCRγδ, CD4, CD8
Идентификационный № опухоли = L4093
Процент от живых
100
80
60
40
20
0
моноциты
NK
B-клетки
TCRαβ
TCRγδ
CD4
CD8
Условие
Исследование
Gen 2 PD1+
Gen 2 DM PD1+
Gen 2 PD1-
Общая масса Gen 2
17-дневн ранний REP

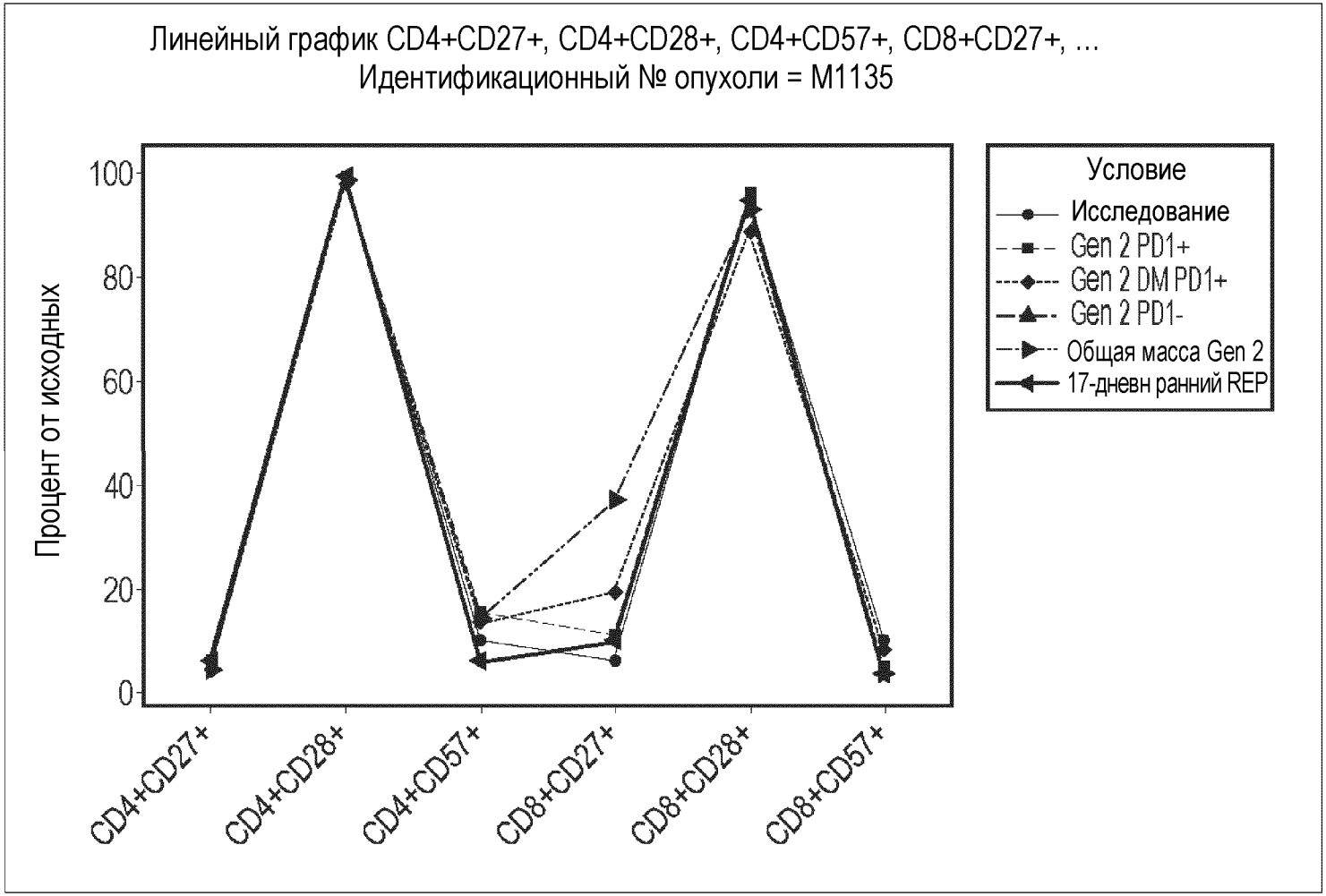
ФИГ. 104


Линейный график моноцитов, NK, B-клеток, TCRαβ, TCRγδ, CD4, CD8
Идентификационный № опухоли = M1135
Процент от живых
100
80
60
40
20
0
моноциты
NK
B-клетки
TCRαβ
TCRγδ
CD4
CD8
Условие
Исследование
Gen 2 PD1+
Gen 2 DM PD1+
Gen 2 PD1-
Общая масса Gen 2
17-дневн ранний REP

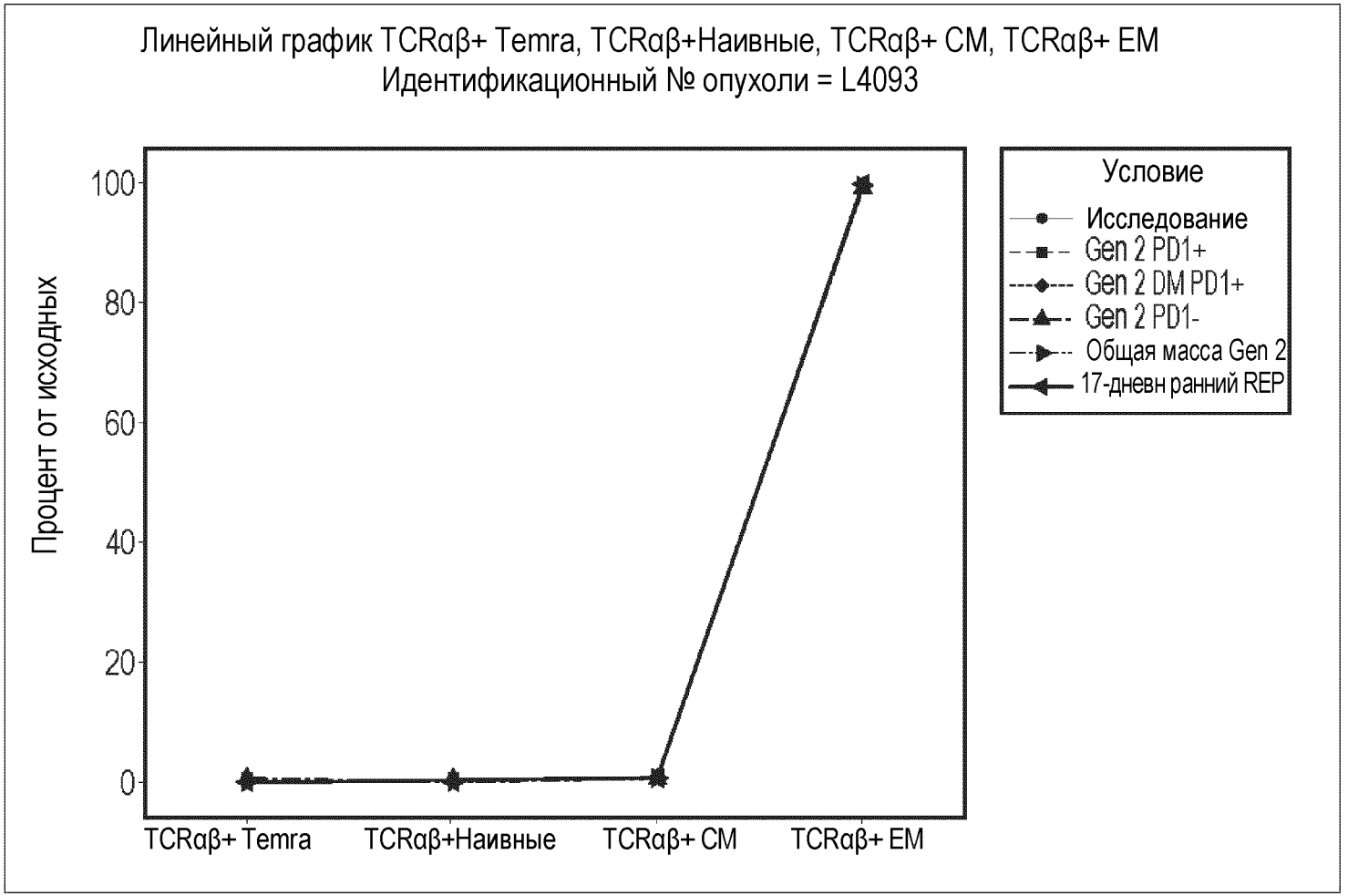
ФИГ. 105


Линейный график CD4+CD27+, CD4+CD28+, CD4+CD57+, CD8+CD27+, ...
Идентификационный № опухоли = L4093
Процент от исходных
100
80
60
40
20
0
CD4+CD27+
CD4+CD28+
CD4+CD57+
CD8+CD27+
CD8+CD28+
CD8+CD57+
Условие
Исследование
Gen 2 PD1+
Gen 2 DM PD1+
Gen 2 PD1-
Общая масса Gen 2
17-дневн ранний REP

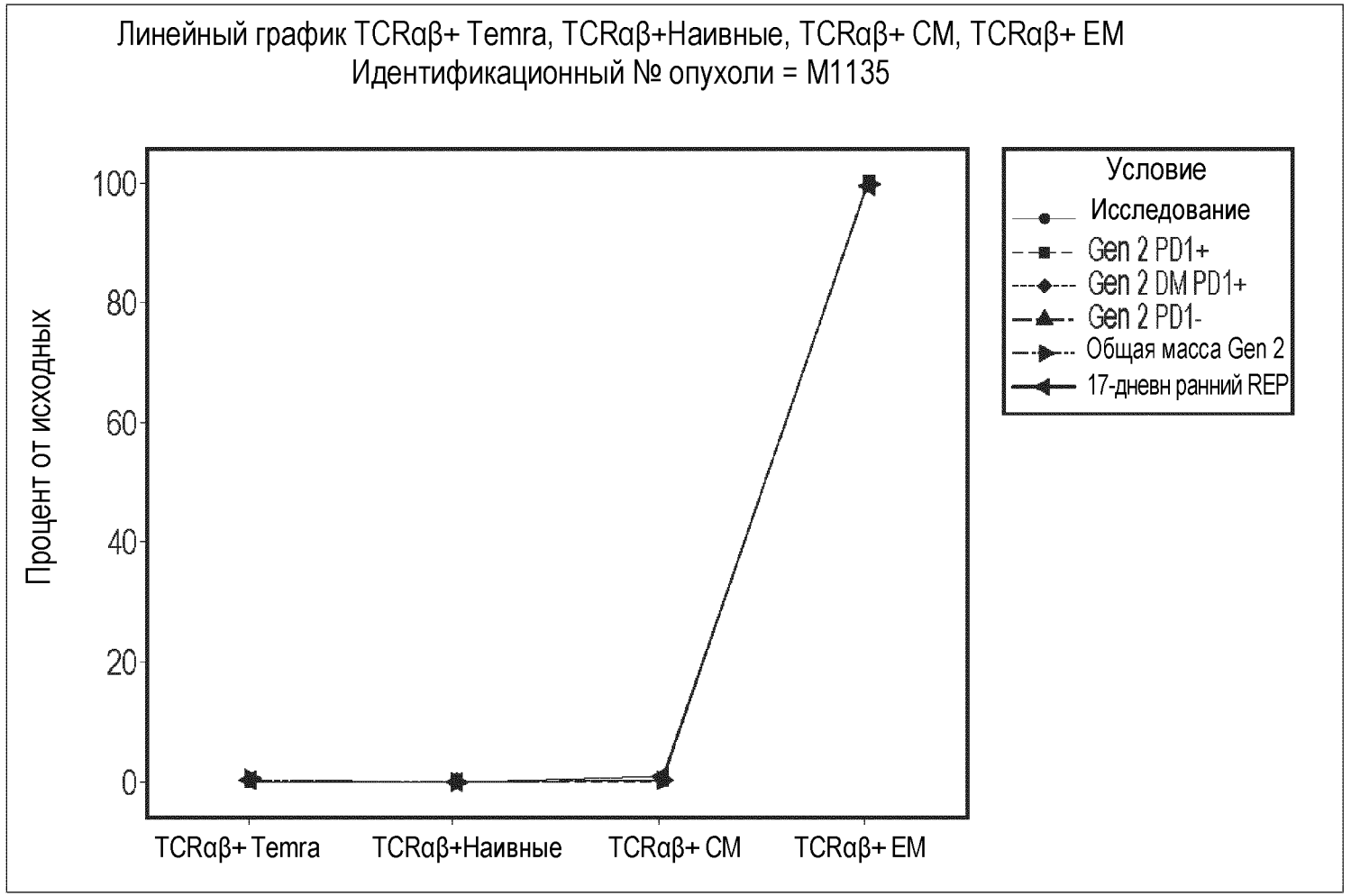
ФИГ. 106A


Линейный график CD4+CD27+, CD4+CD28+, CD4+CD57+, CD8+CD27+, ...
Идентификационный № опухоли = M1135
Процент от исходных
100
80
60
40
20
0
CD4+CD27+
CD4+CD28+
CD4+CD57+
CD8+CD27+
CD8+CD28+
CD8+CD57+
Условие
Исследование
Gen 2 PD1+
Gen 2 DM PD1+
Gen 2 PD1-
Общая масса Gen 2
17-дневн ранний REP

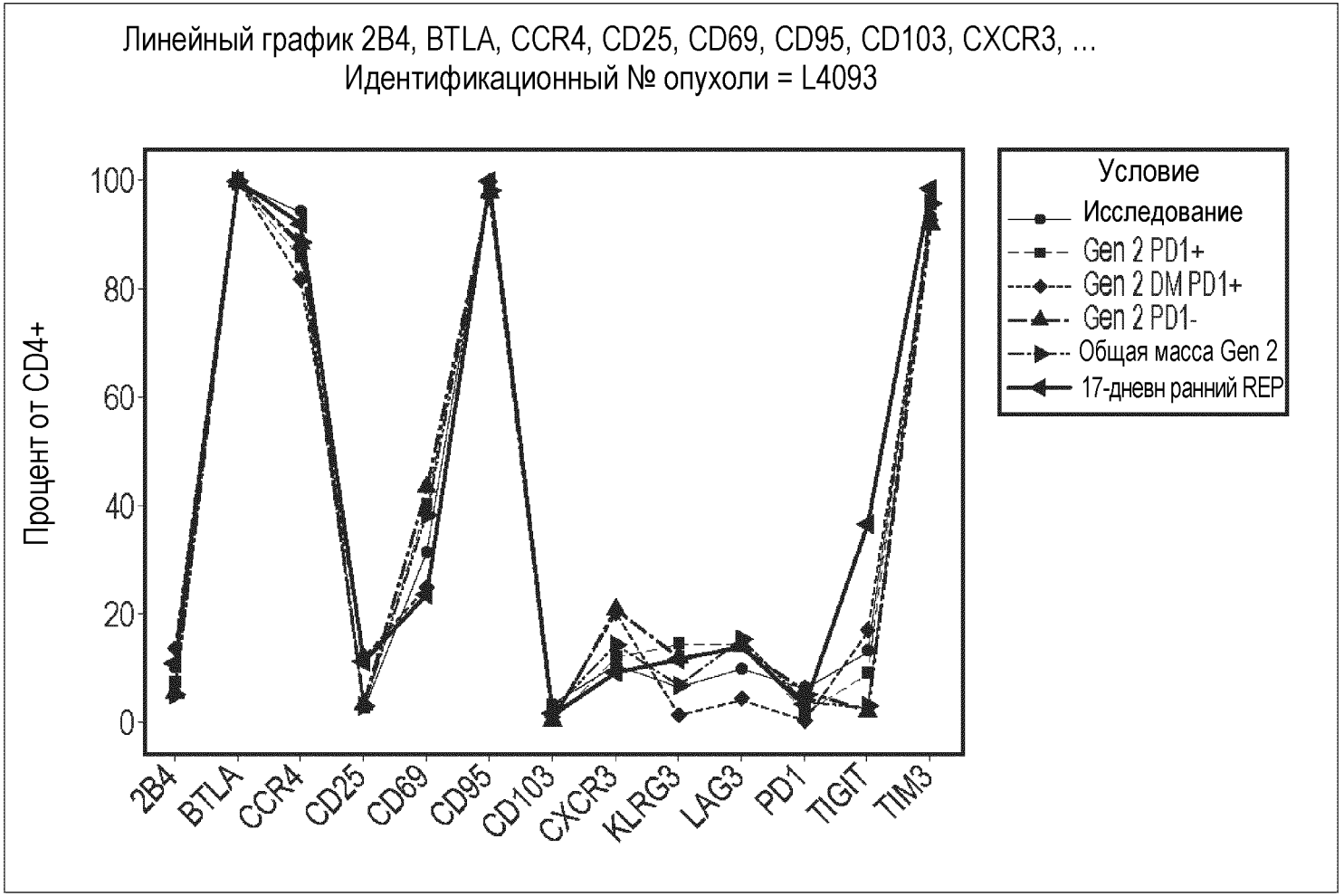
ФИГ. 106B


Линейный график TCRαβ+ Temra, TCRαβ+Наивные, TCRαβ+ CM, TCRαβ+ EM
Идентификационный № опухоли = L4093
Процент от исходных
100
80
60
40
20
0
TCRαβ+ Temra
TCRαβ+Наивные
TCRαβ+ CM
TCRαβ+ EM
Условие
Исследование
Gen 2 PD1+
Gen 2 DM PD1+
Gen 2 PD1-
Общая масса Gen 2
17-дневн ранний REP

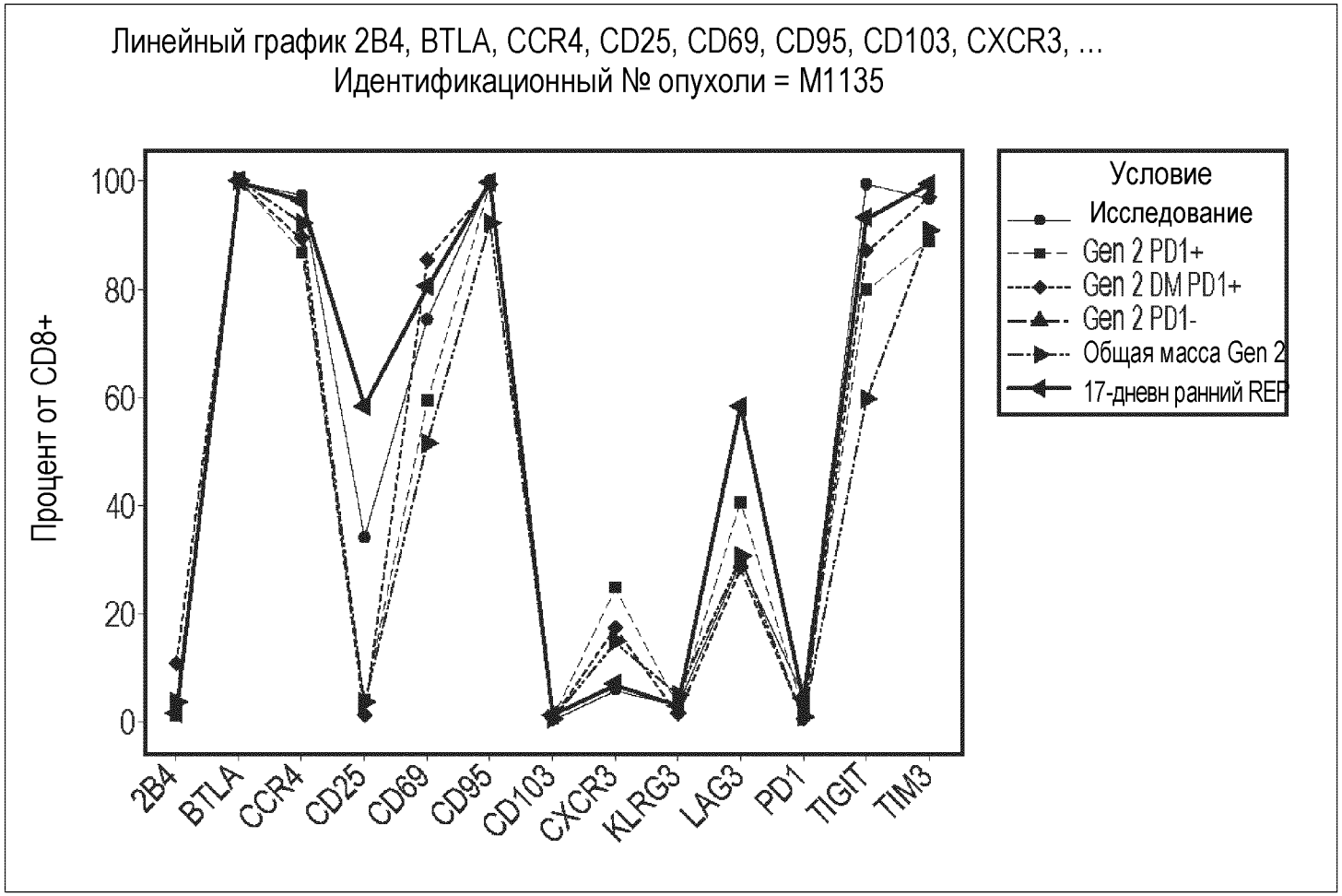
ФИГ. 107A


Линейный график TCRαβ+ Temra, TCRαβ+Наивные, TCRαβ+ CM, TCRαβ+ EM
Идентификационный № опухоли = M1135
Процент от исходных
100
80
60
40
20
0
TCRαβ+ Temra
TCRαβ+Наивные
TCRαβ+ CM
TCRαβ+ EM
Условие
Исследование
Gen 2 PD1+
Gen 2 DM PD1+
Gen 2 PD1-
Общая масса Gen 2
17-дневн ранний REP

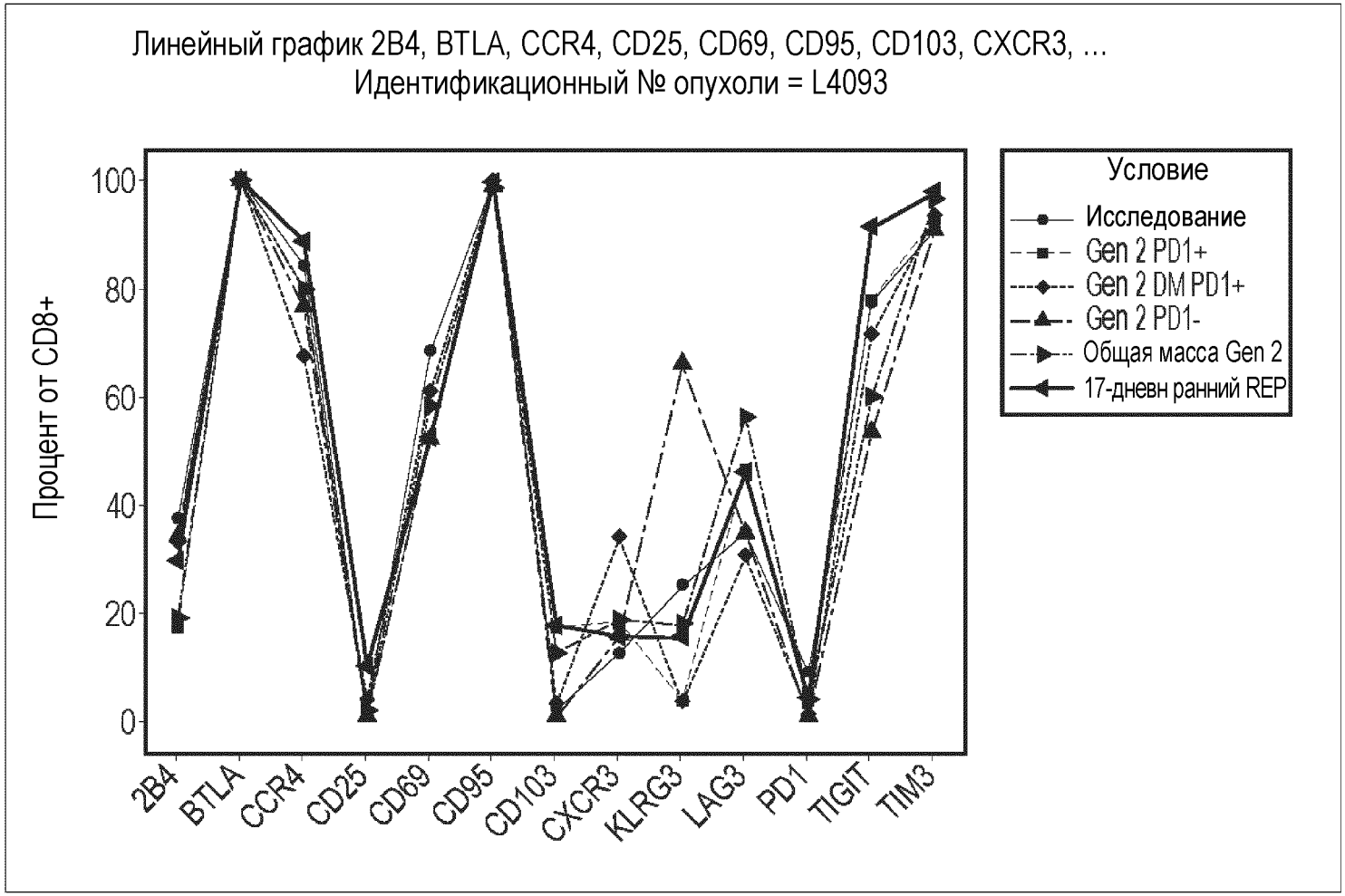
ФИГ. 107B


Линейный график 2B4, BTLA, CCR4, CD25, CD69, CD95, CD103, CXCR3, ...
Идентификационный № опухоли = L4093
Процент от CD4+
100
80
60
40
20
0
2B4
BTLA
CCR4
CD25
CD69
CD95
CD103
CXCR3
KLRG3
LAG3
PD1
TIGIT
TIM3
Условие
Исследование
Gen 2 PD1+
Gen 2 DM PD1+
Gen 2 PD1-
Общая масса Gen 2
17-дневн ранний REP

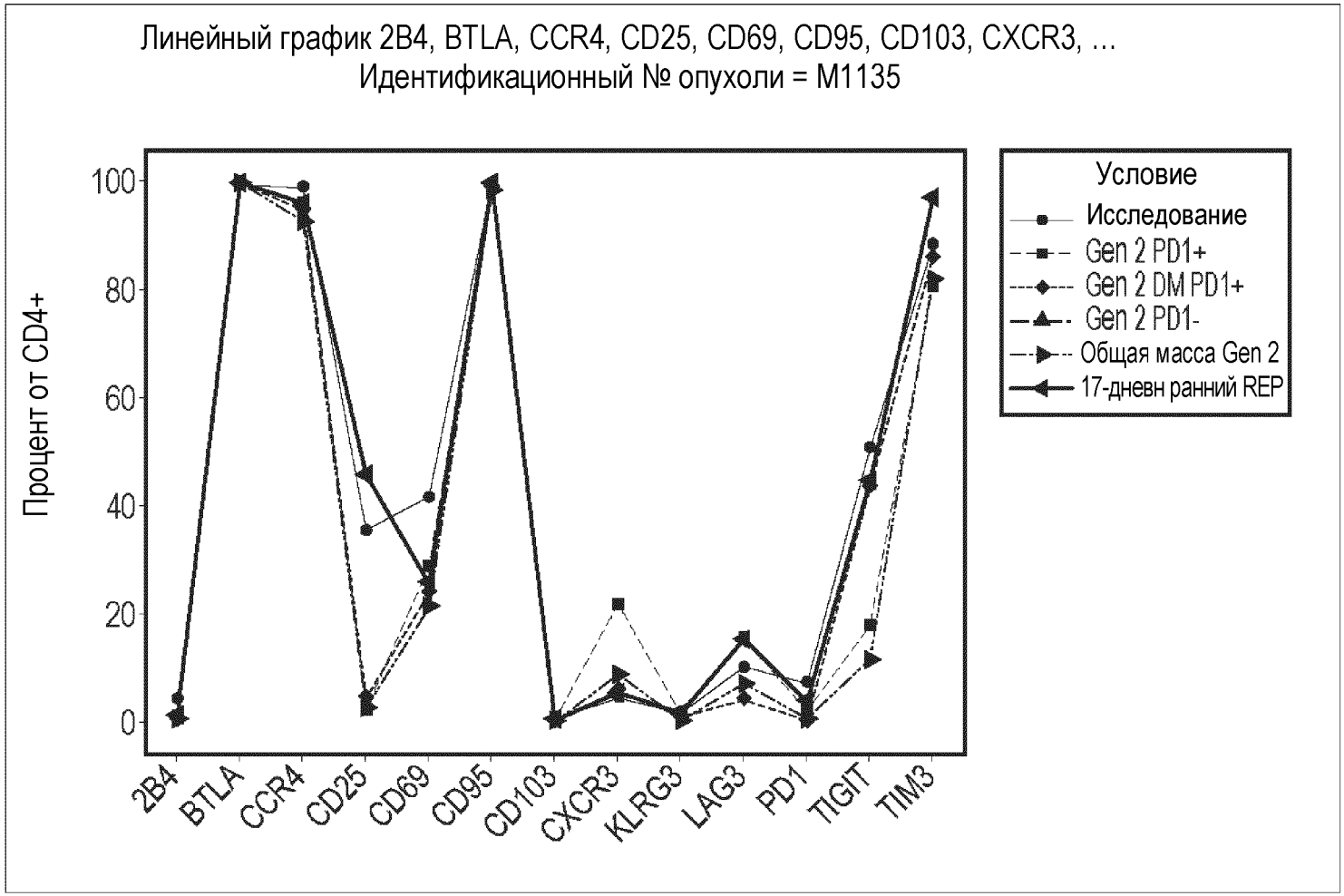
ФИГ. 108A


Линейный график 2B4, BTLA, CCR4, CD25, CD69, CD95, CD103, CXCR3, ...
Идентификационный № опухоли = M1135
Процент от CD8+
100
80
60
40
20
0
2B4
BTLA
CCR4
CD25
CD69
CD95
CD103
CXCR3
KLRG3
LAG3
PD1
TIGIT
TIM3
Условие
Исследование
Gen 2 PD1+
Gen 2 DM PD1+
Gen 2 PD1-
Общая масса Gen 2
17-дневн ранний REP

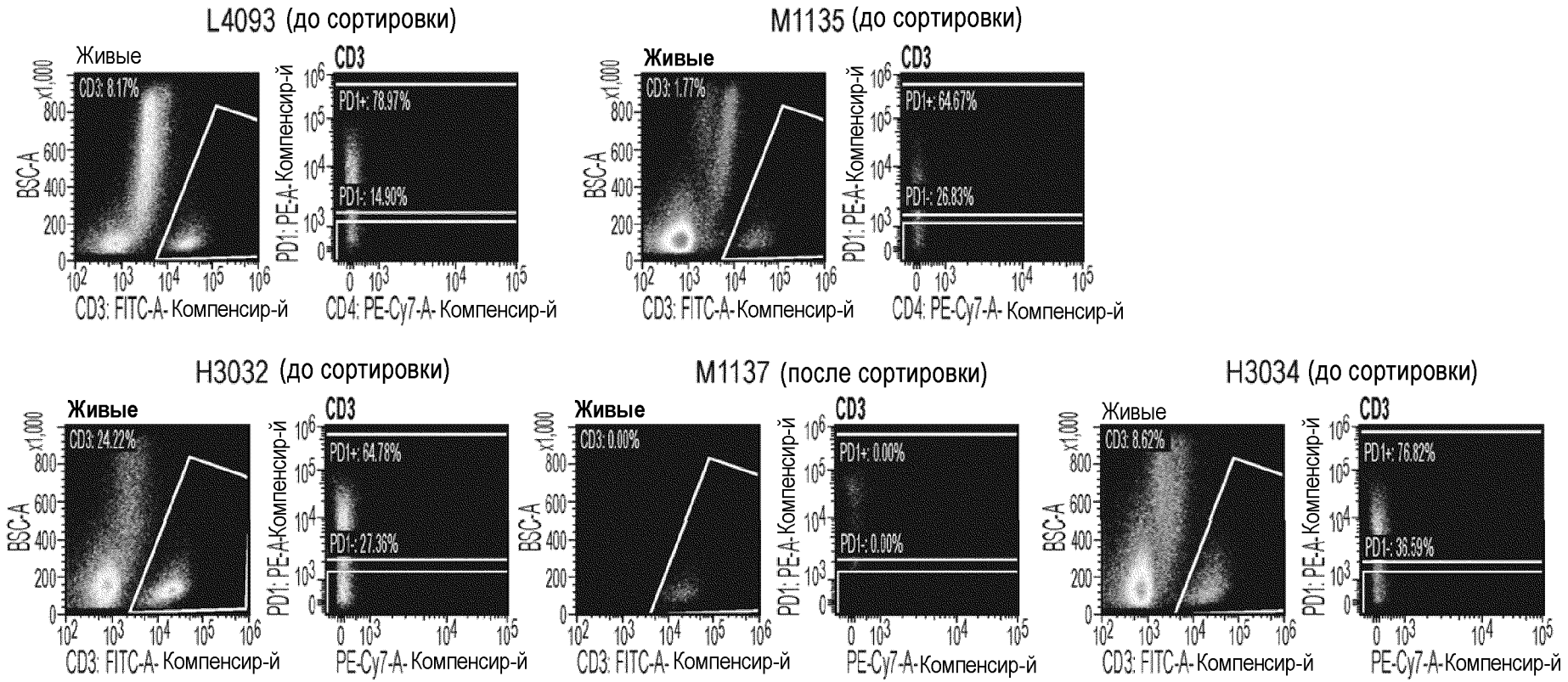
ФИГ. 108B


Линейный график 2B4, BTLA, CCR4, CD25, CD69, CD95, CD103, CXCR3, ...
Идентификационный № опухоли = L4093
Процент от CD8+
100
80
60
40
20
0
2B4
BTLA
CCR4
CD25
CD69
CD95
CD103
CXCR3
KLRG3
LAG3
PD1
TIGIT
TIM3
Условие
Исследование
Gen 2 PD1+
Gen 2 DM PD1+
Gen 2 PD1-
Общая масса Gen 2
17-дневн ранний REP

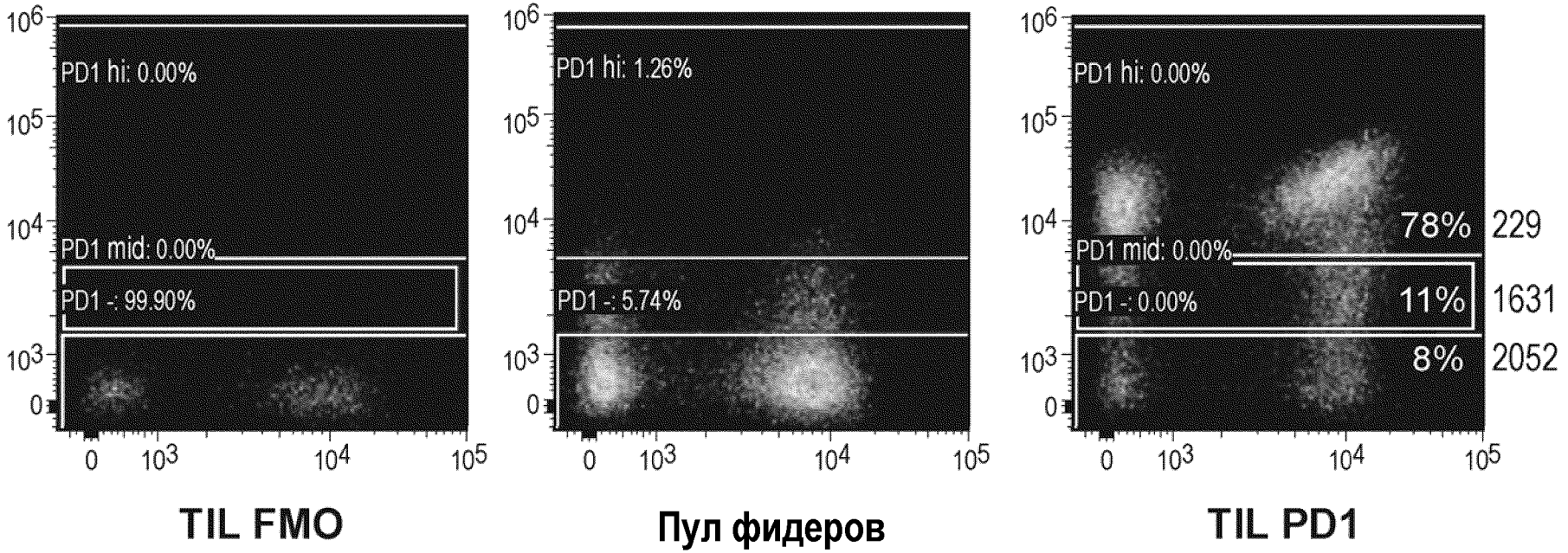
ФИГ. 109A


Линейный график 2B4, BTLA, CCR4, CD25, CD69, CD95, CD103, CXCR3, ...
Идентификационный № опухоли = M1135
Процент от CD4+
100
80
60
40
20
0
2B4
BTLA
CCR4
CD25
CD69
CD95
CD103
CXCR3
KLRG3
LAG3
PD1
TIGIT
TIM3
Условие
Исследование
Gen 2 PD1+
Gen 2 DM PD1+
Gen 2 PD1-
Общая масса Gen 2
17-дневн ранний REP

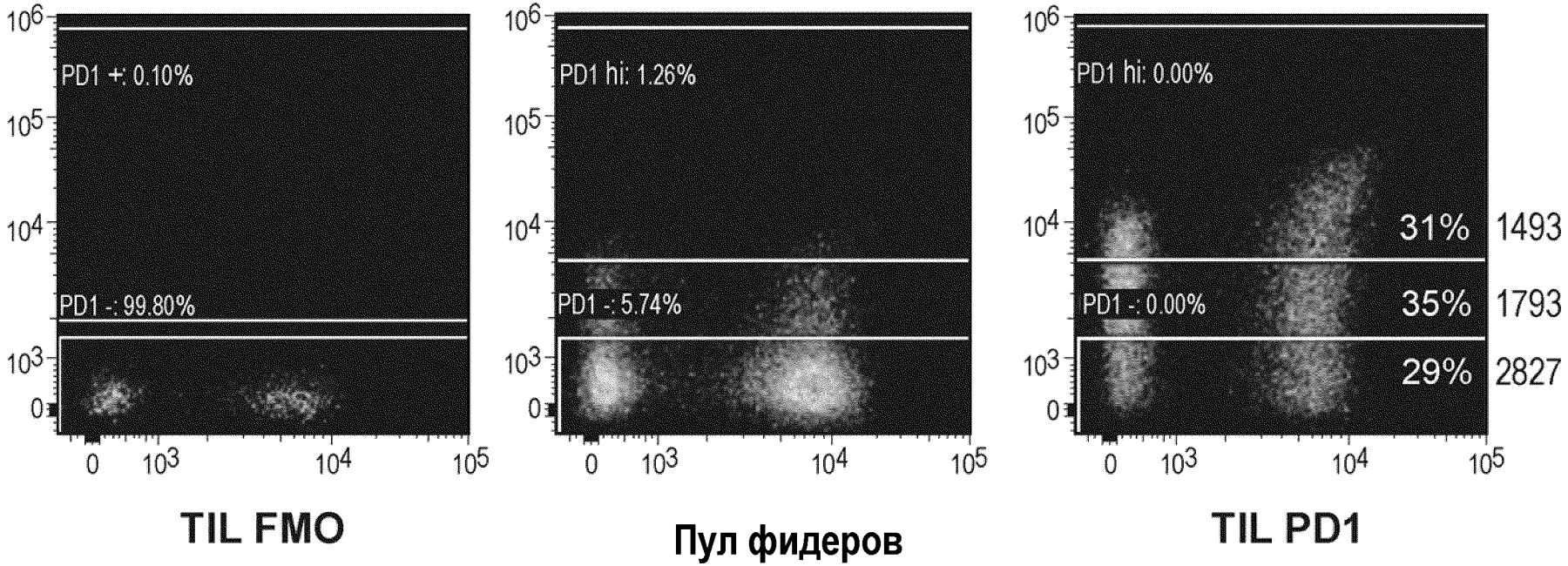
ФИГ. 109B


L4093 (до сортировки)
Живые
CD3: 8.17%
BSC-A
CD3: FITC-A- Компенсир-й
CD3
PD1+: 78.97%
PD1-: 14.90%
PD1: PE-A-Компенсир-й
CD4: PE-Cy7-A- Компенсир-й
M1135 (до сортировки)
Живые
CD3: 1.77%
CD3
PD1+: 64.67%
PD1-: 26.83%
H3032 (до сортировки)
Живые
CD3: 24.22%
CD3
PD1+: 64.78%
PD1-: 27.36%
PE-Cy7-A- Компенсир-й
M1137 (после сортировки)
Живые
CD3: 0.00%
CD3
PD1+: 0.00%
PD1-: 0.00%
H3034 (до сортировки)
Живые
CD3: 8.62%
CD3
PD1+: 76.82%
PD1-: 36.59%

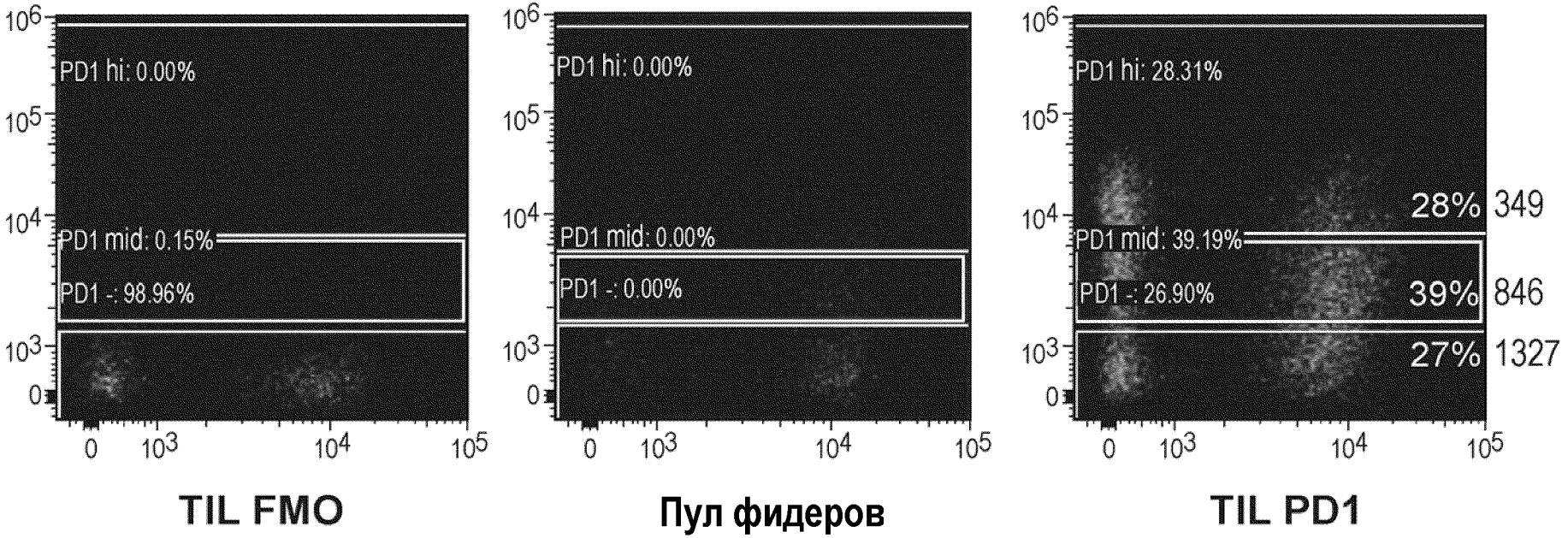
ФИГ. 110


PD1 hi: 0.00%
PD1 mid: 0.00%
PD1 -: 99.90%
TIL FMO
PD1 hi: 1.26%
PD1 -: 5.74%
Пул фидеров
PD1 hi: 0.00%
78%
229
PD1 mid: 0.00%
PD1 -: 0.00%
11%
1631
8%
2052
TIL PD1

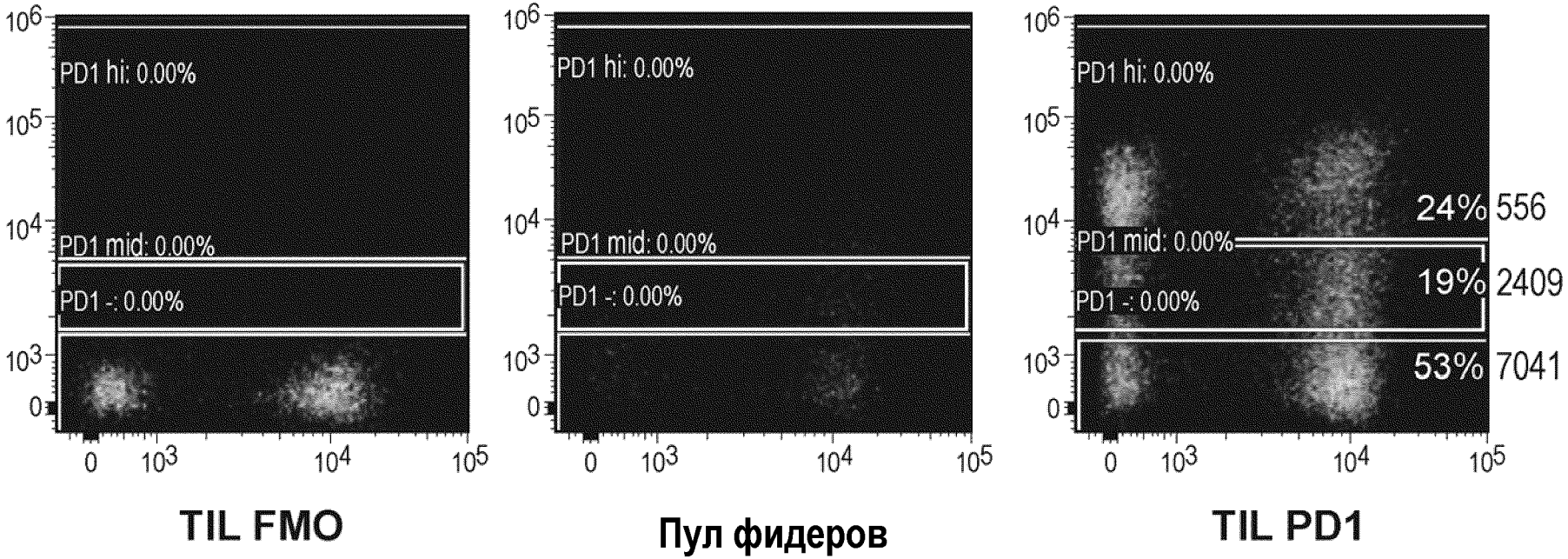
ФИГ. 111


PD1 +: 0.10%
PD1 -: 99.80%
TIL FMO
PD1 hi: 1.26%
PD1 -: 5.74%
Пул фидеров
PD1 hi: 0.00%
PD1 -: 0.00%
31%
1493
35%
1793
29%
2827
TIL PD1

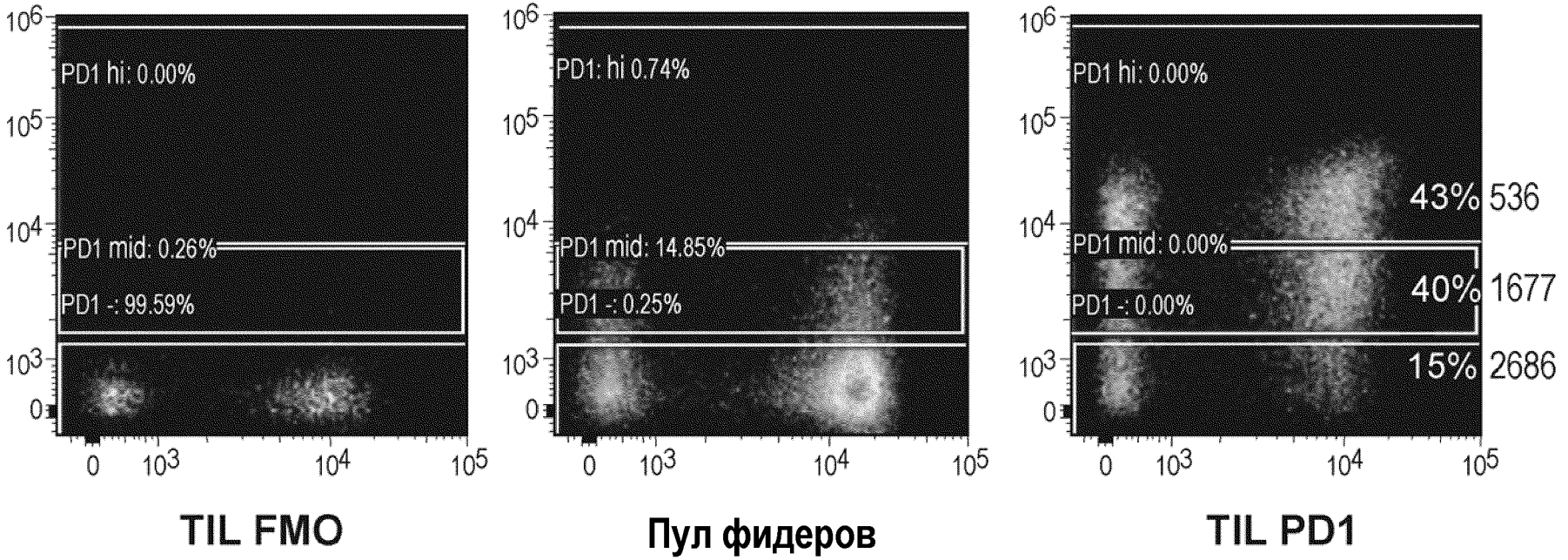
ФИГ. 112


PD1 hi: 0.00%
PD1 mid: 0.15%
PD1 -: 98.96%
TIL FMO
PD1 hi: 0.00%
PD1 mid: 0.00%
PD1 -: 0.00%
Пул фидеров
PD1 hi: 28.31%
28% 349
PD1 mid: 39.19%
39% 846
PD1 -: 26.90%
27% 1327
TIL PD1

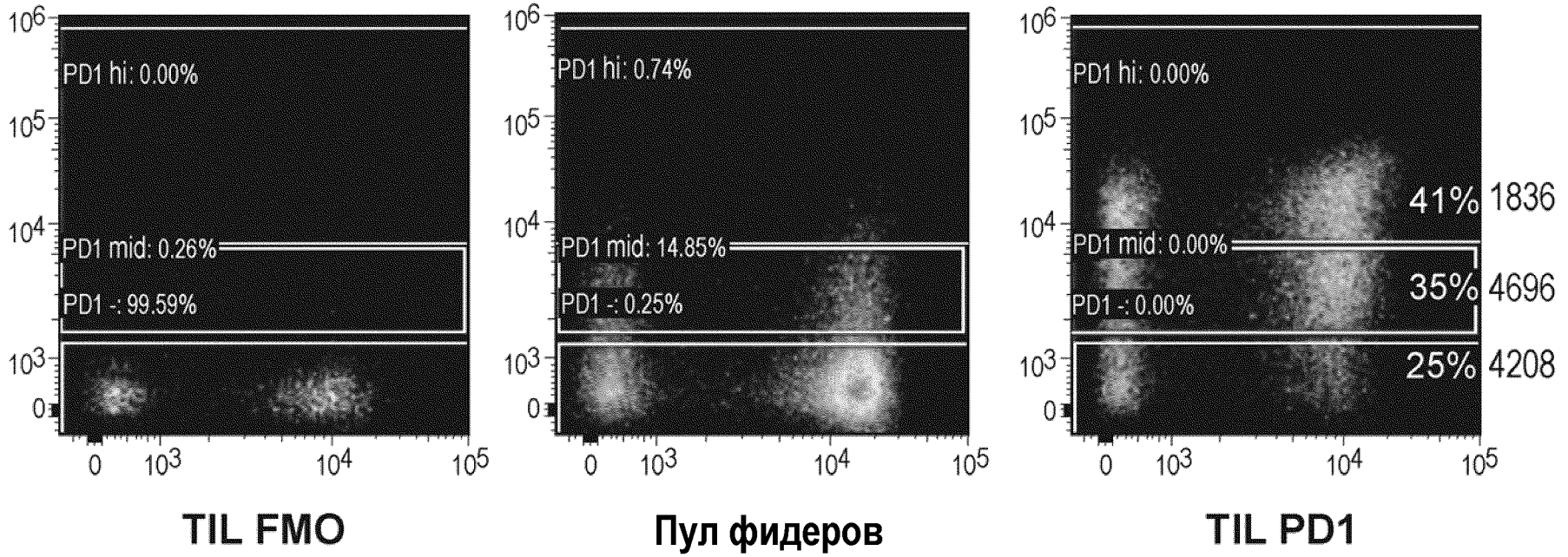
ФИГ. 113


PD1 hi: 0.00%
PD1 mid: 0.00%
PD1 -: 0.00%
TIL FMO
PD1 hi: 0.00%
PD1 mid: 0.00%
PD1 -: 0.00%
Пул фидеров
PD1 hi: 0.00%
PD1 mid: 0.00%
PD1 -: 0.00%
24% 556
19% 2409
53% 7041
TIL PD1

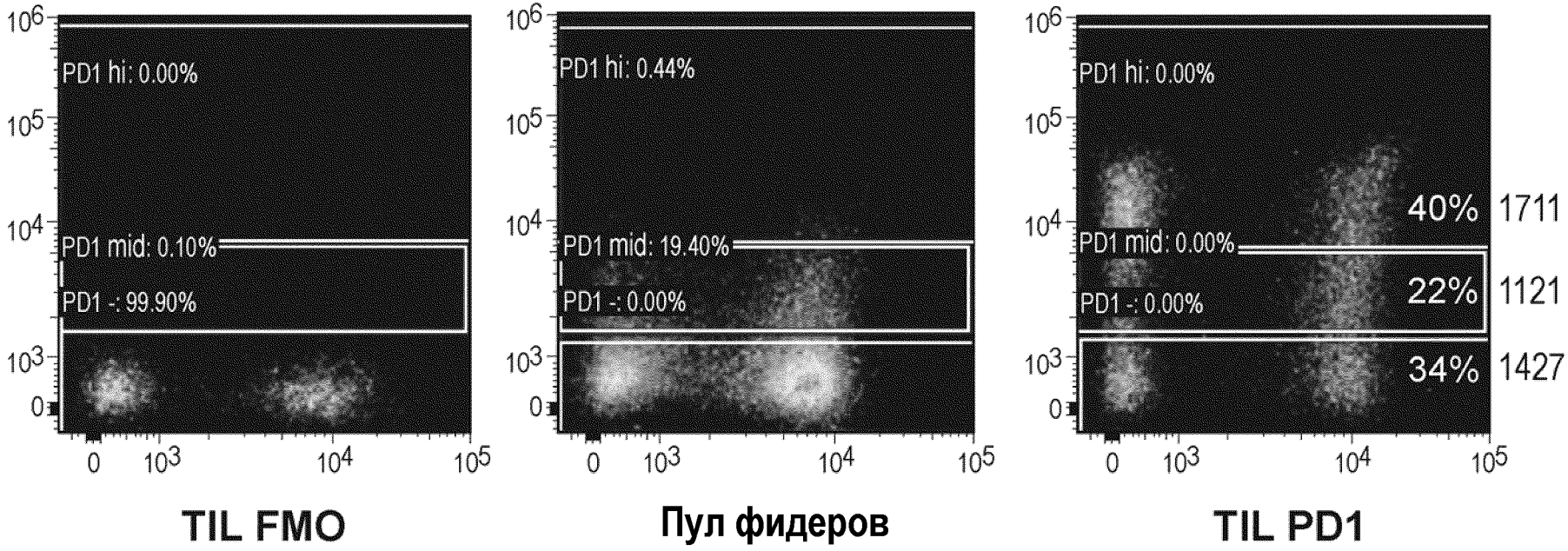
ФИГ. 114


PD1 hi: 0.00%
PD1 mid: 0.26%
PD1 -: 99.59%
TIL FMO
PD1: hi 0.74%
PD1 mid: 14.85%
PD1 -: 0.25%
Пул фидеров
PD1 hi: 0.00%
43% 536
PD1 mid: 0.00%
40% 1677
PD1 -: 0.00%
15% 2686
TIL PD1

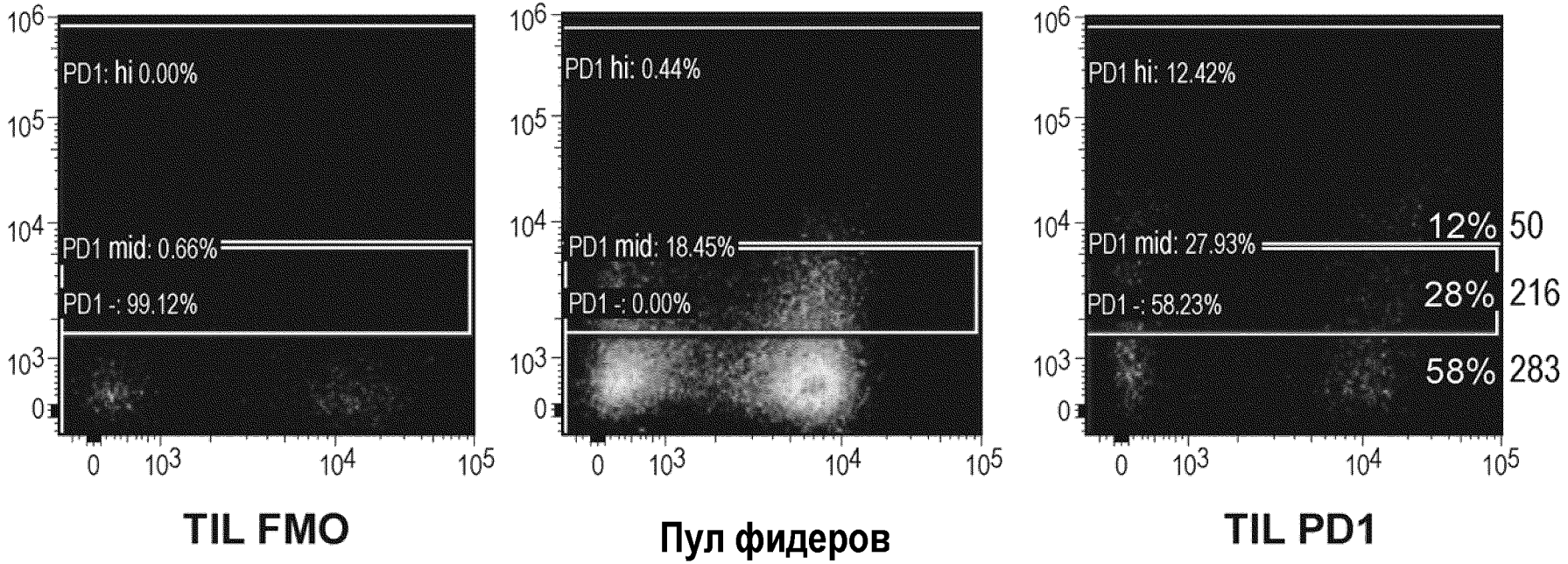
ФИГ. 115


PD1 hi: 0.00%
PD1 mid: 0.26%
PD1 -: 99.59%
TIL FMO
PD1 hi: 0.74%
PD1 mid: 14.85%
PD1 -: 0.25%
Пул фидеров
PD1 hi: 0.00%
41% 1836
PD1 mid: 0.00%
35% 4696
PD1 -: 0.00%
25% 4208
TIL PD1

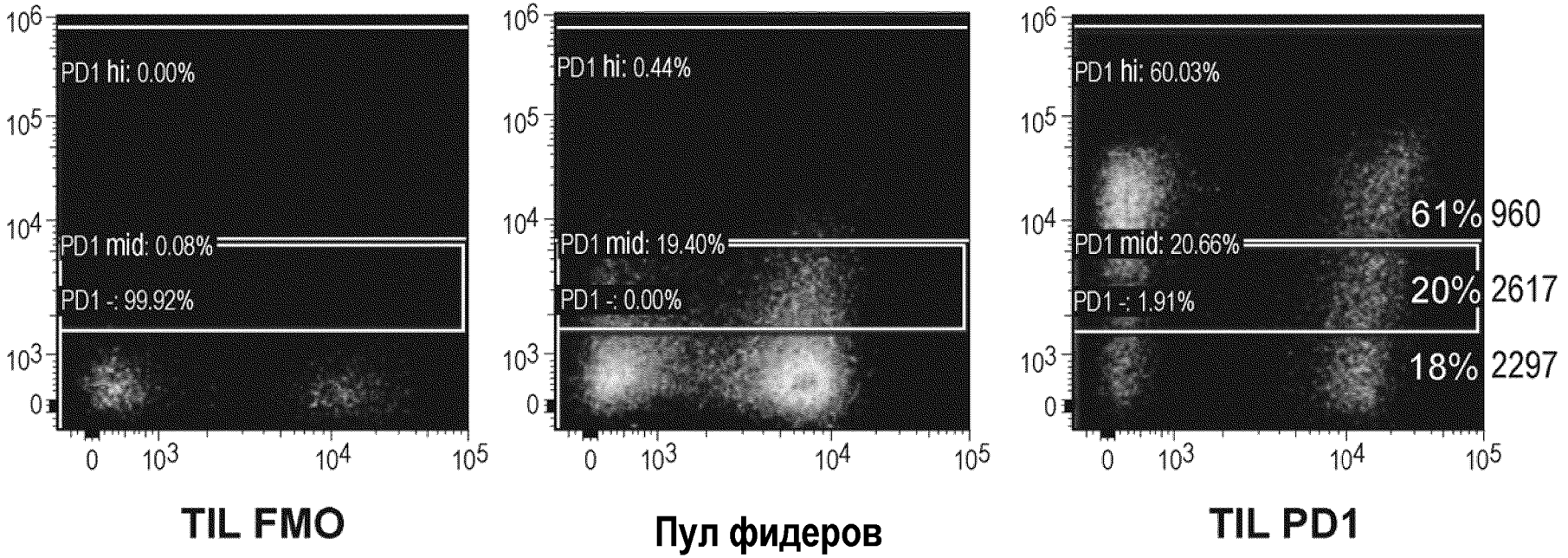
ФИГ. 116


PD1 hi: 0.00%
PD1 mid: 0.10%
PD1 -: 99.90%
TIL FMO
PD1 hi: 0.44%
PD1 mid: 19.40%
PD1 -: 0.00%
Пул фидеров
PD1 hi: 0.00%
PD1 mid: 0.00%
PD1 -: 0.00%
40% 1711
22% 1121
34% 1427
TIL PD1

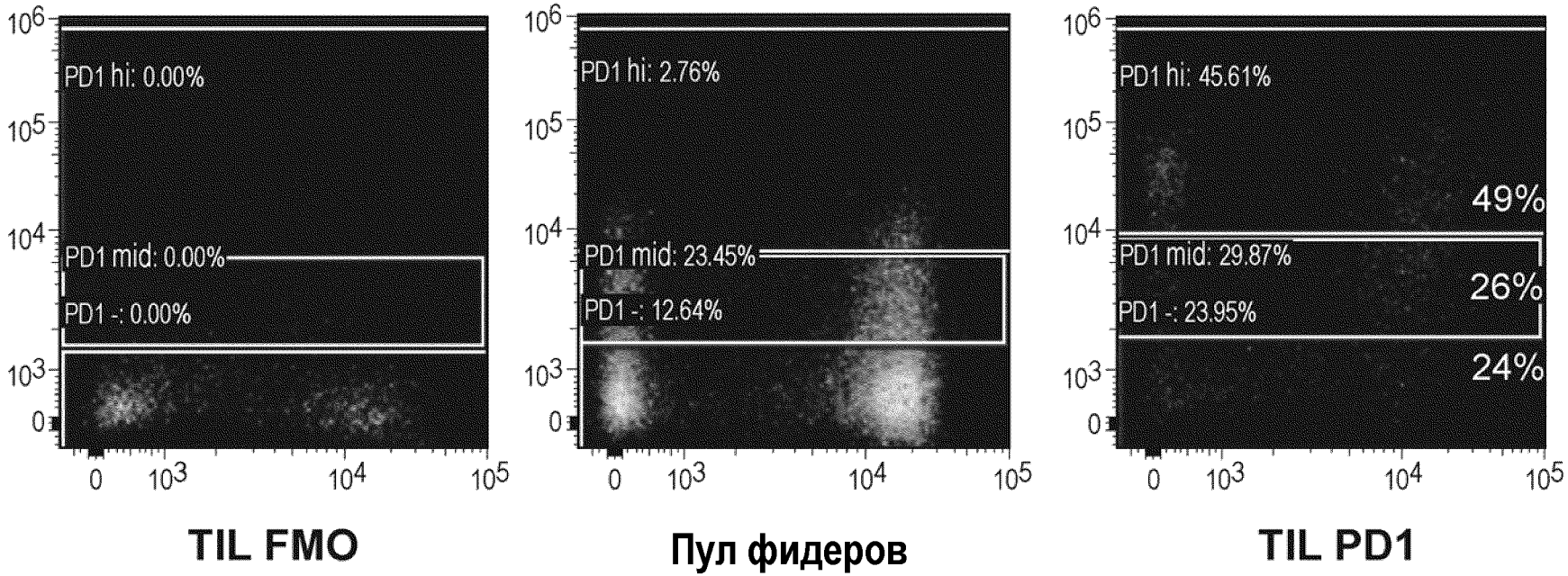
ФИГ. 117


PD1: hi 0.00%
PD1 mid: 0.66%
PD1 -: 99.12%
TIL FMO
PD1 hi: 0.44%
PD1 mid: 18.45%
PD1 -: 0.00%
Пул фидеров
PD1 hi: 12.42%
PD1 mid: 27.93%
PD1 -: 58.23%
12% 50
28% 216
58% 283
TIL PD1

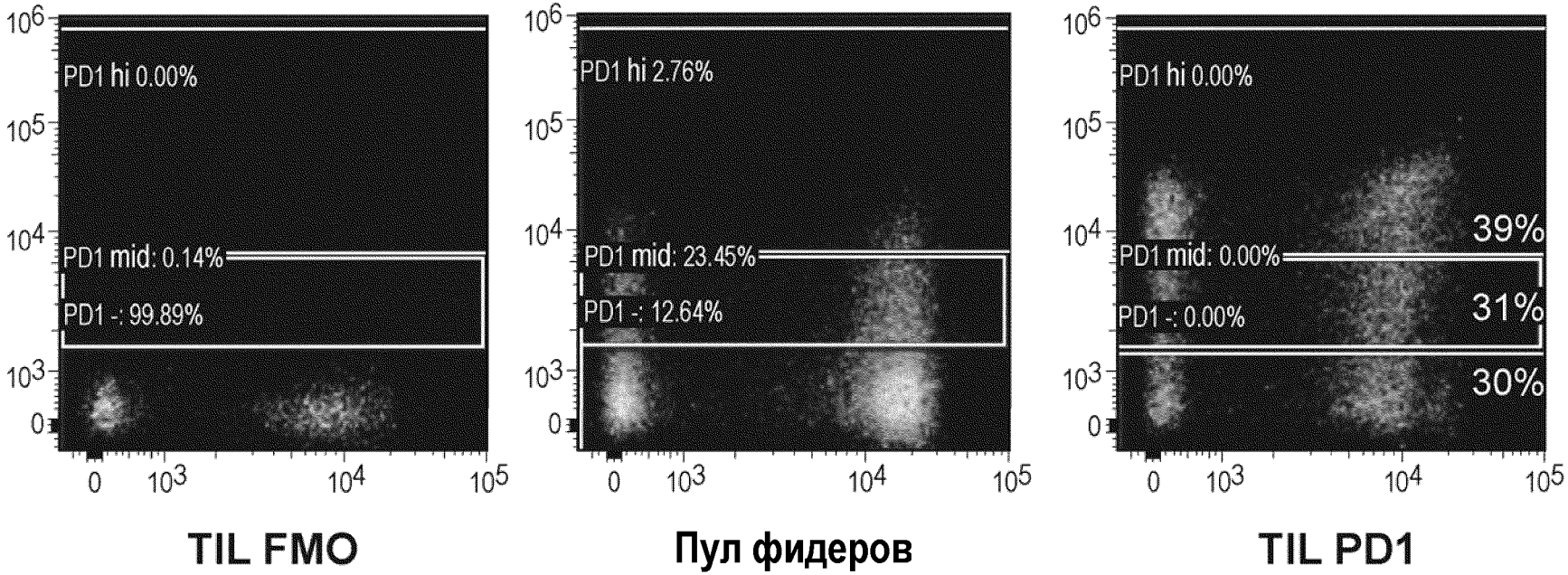
ФИГ. 118


PD1 hi: 0.00%
PD1 mid: 0.08%
PD1 -: 99.92%
TIL FMO
PD1 hi: 0.44%
PD1 mid: 19.40%
PD1 -: 0.00%
Пул фидеров
PD1 hi: 60.03%
PD1 mid: 20.66%
PD1 -: 1.91%
61% 960
20% 2617
18% 2297
TIL PD1

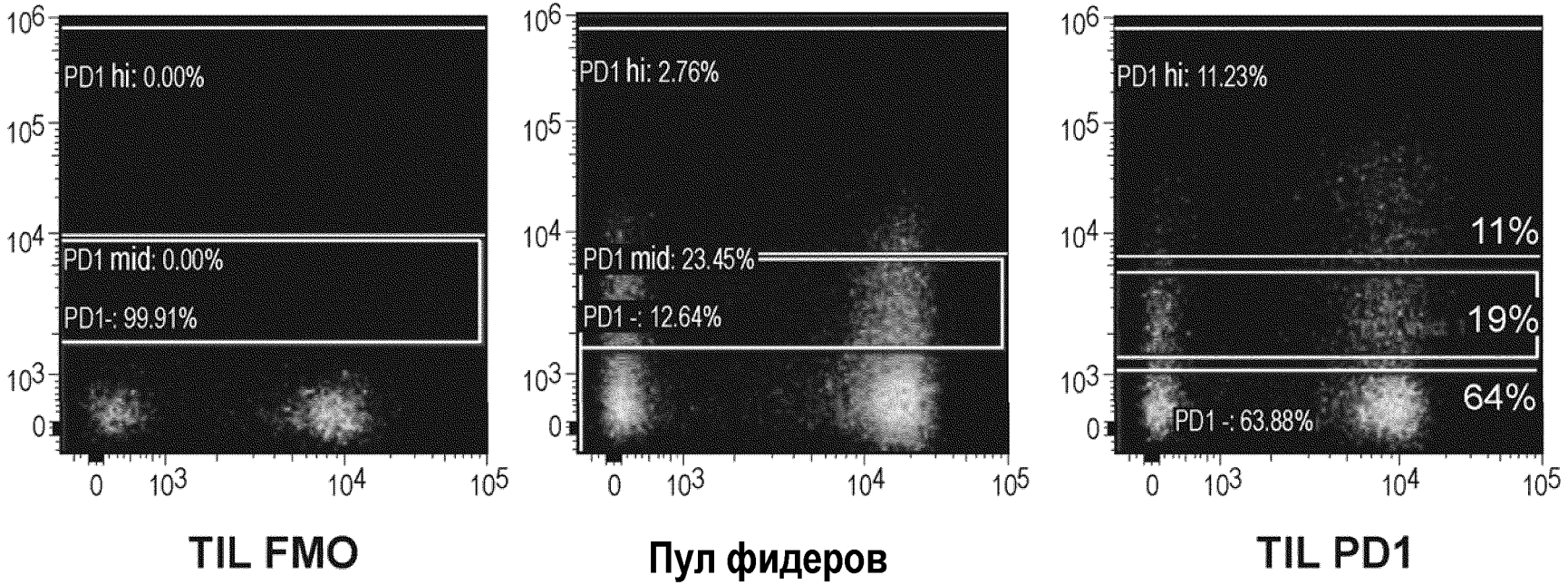
ФИГ. 119


PD1 hi: 0.00%
PD1 mid: 0.00%
PD1 -: 0.00%
TIL FMO
PD1 hi: 2.76%
PD1 mid: 23.45%
PD1 -: 12.64%
Пул фидеров
PD1 hi: 45.61%
49%
PD1 mid: 29.87%
26%
PD1 -: 23.95%
24%
TIL PD1

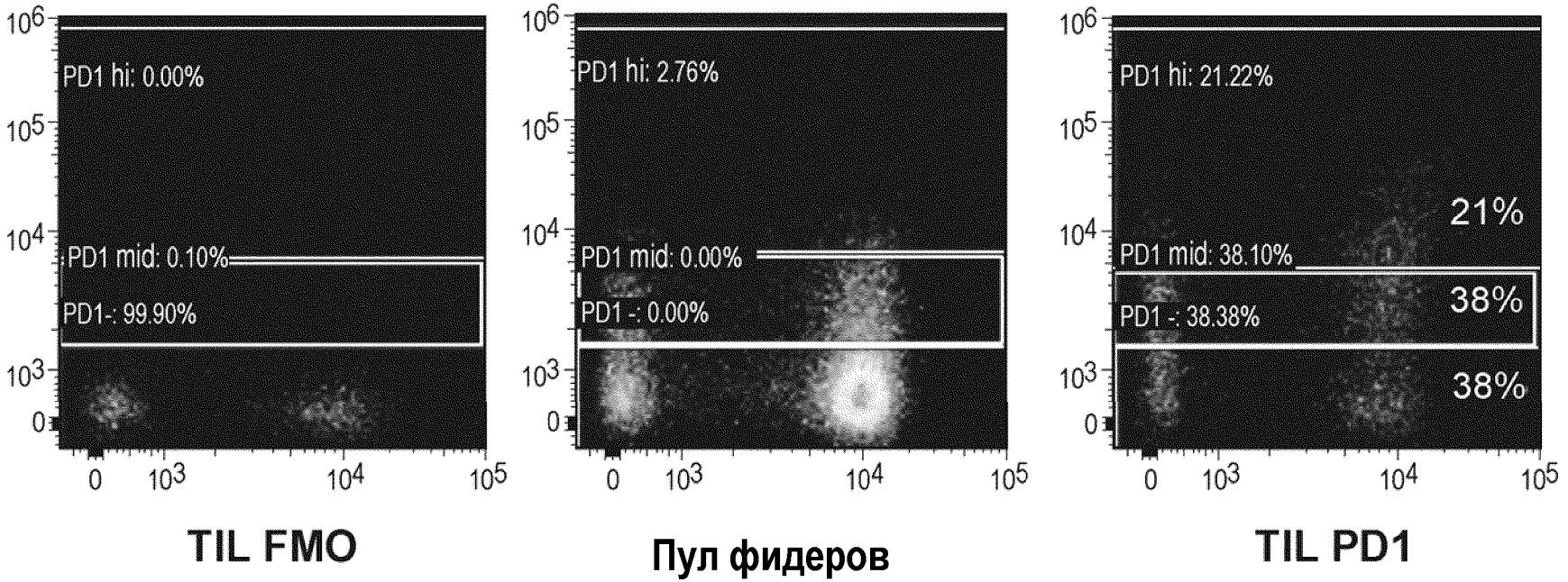
ФИГ. 120


PD1 hi 0.00%
PD1 mid: 0.14%
PD1 -: 99.89%
TIL FMO
PD1 hi 2.76%
PD1 mid: 23.45%
PD1 -: 12.64%
Пул фидеров
PD1 hi 0.00%
PD1 mid: 0.00%
PD1 -: 0.00%
39%
31%
30%
TIL PD1

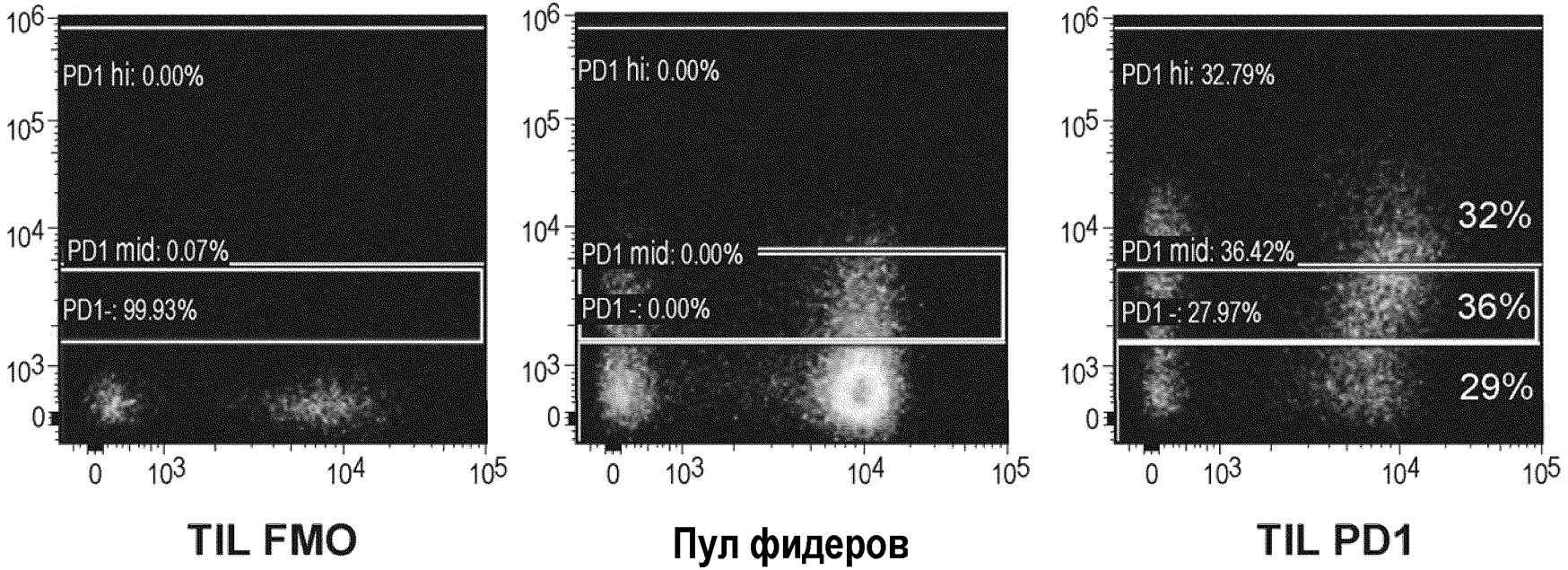
ФИГ. 121


PD1 hi: 0.00%
PD1 mid: 0.00%
PD1-: 99.91%
TIL FMO
PD1 hi: 2.76%
PD1 mid: 23.45%
PD1 -: 12.64%
Пул фидеров
PD1 hi: 11.23%
11%
19%
64%
PD1 -: 63.88%
TIL PD1

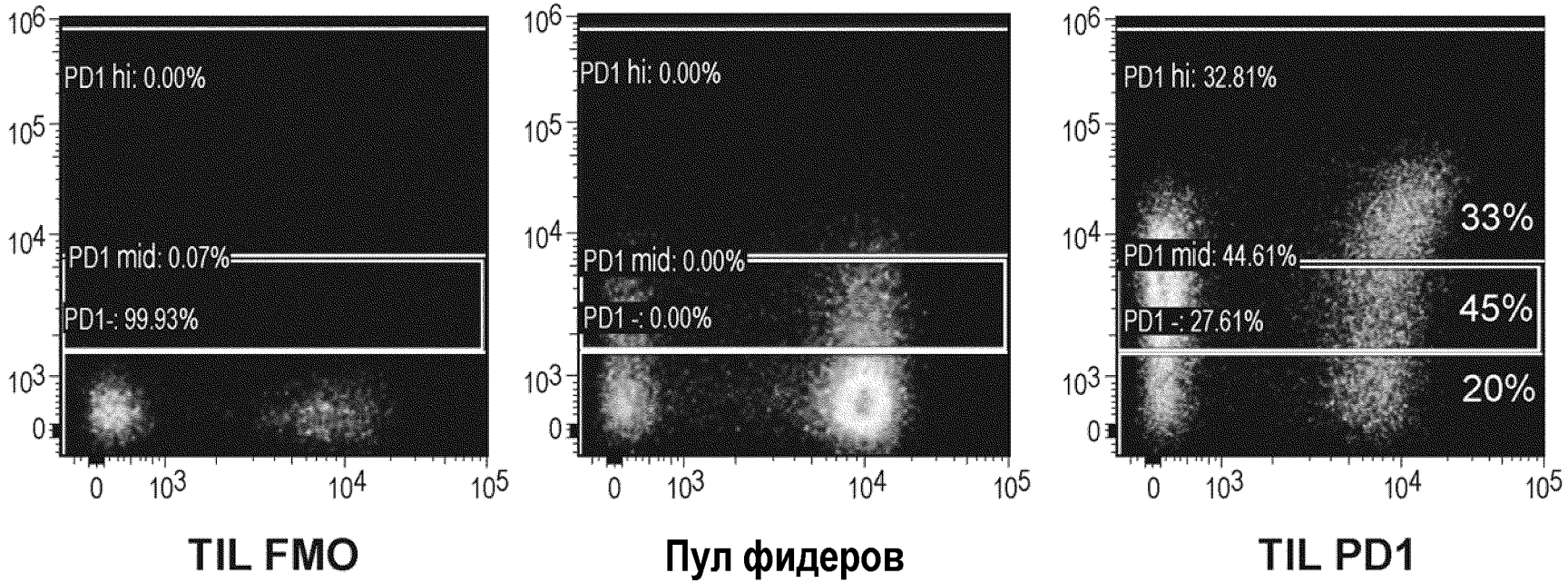
ФИГ. 122


PD1 hi: 0.00%
PD1 mid: 0.10%
PD1-: 99.90%
TIL FMO
PD1 hi: 2.76%
PD1 mid: 0.00%
PD1 -: 0.00%
Пул фидеров
PD1 hi: 21.22%
21%
PD1 mid: 38.10%
38%
PD1 -: 38.38%
38%
TIL PD1

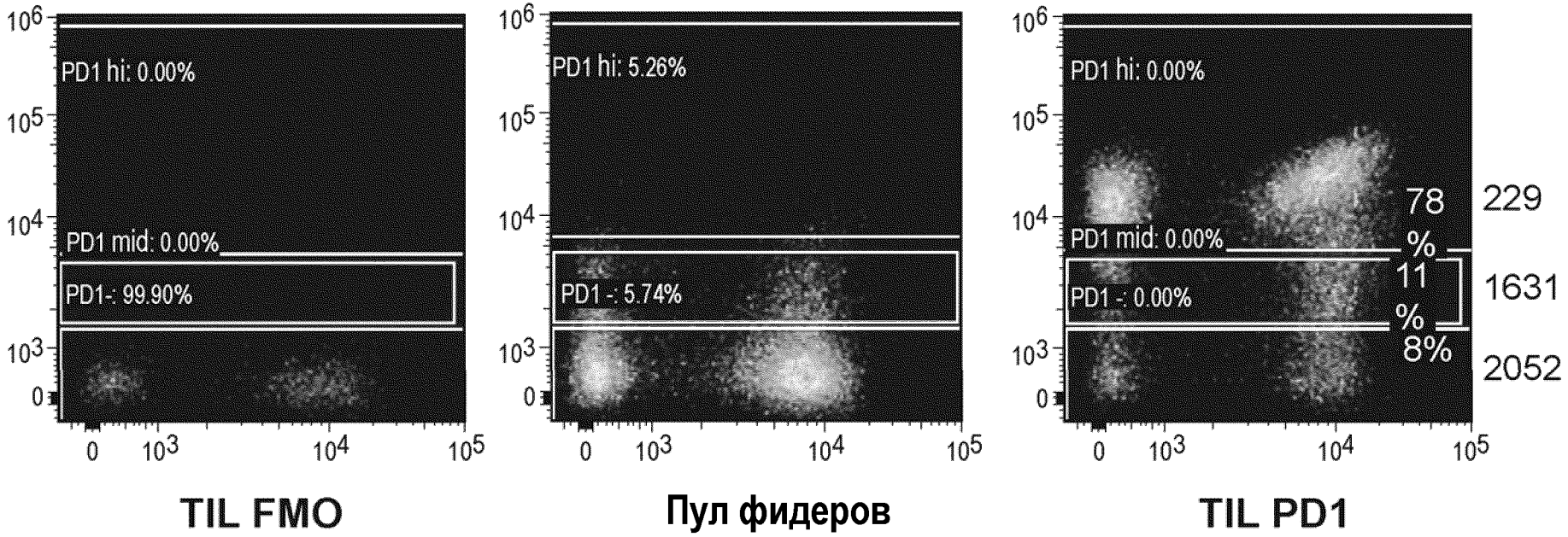
ФИГ. 123


PD1 hi: 0.00%
PD1 mid: 0.07%
PD1-: 99.93%
TIL FMO
PD1 hi: 0.00%
PD1 mid: 0.00%
PD1 -: 0.00%
Пул фидеров
PD1 hi: 32.79%
PD1 mid: 36.42%
PD1 -: 27.97%
32%
36%
29%
TIL PD1

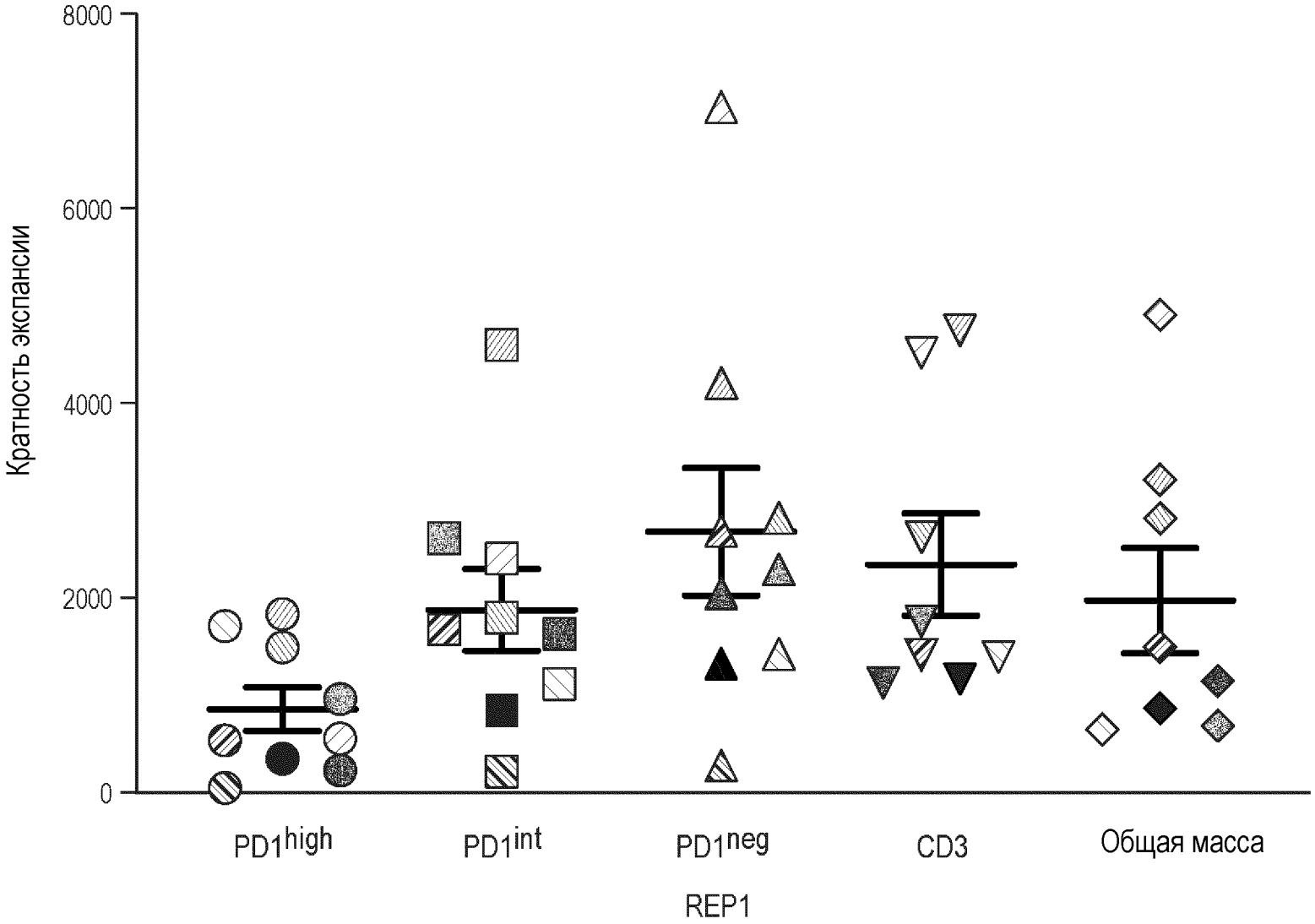
ФИГ. 124


PD1 hi: 0.00%
PD1 mid: 0.07%
PD1-: 99.93%
TIL FMO
PD1 hi: 0.00%
PD1 mid: 0.00%
PD1 -: 0.00%
Пул фидеров
PD1 hi: 32.81%
PD1 mid: 44.61%
PD1 -: 27.61%
33%
45%
20%
TIL PD1

ФИГ. 125


PD1 hi: 0.00%
PD1 mid: 0.00%
PD1-: 99.90%
TIL FMO
PD1 hi: 5.26%
PD1 -: 5.74%
Пул фидеров
PD1 hi: 0.00%
PD1 mid: 0.00%
PD1 -: 0.00%
78 %
11 %
8%
229
1631
2052
TIL PD1

ФИГ. 126


8000
6000
4000
2000
0
Кратность экспансии
PD1high
PD1int
PD1neg
CD3
Общая масса
REP1

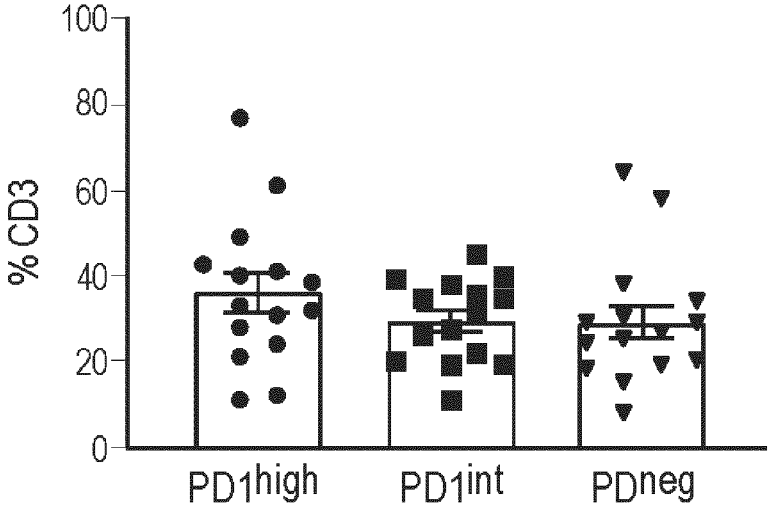
ФИГ. 127

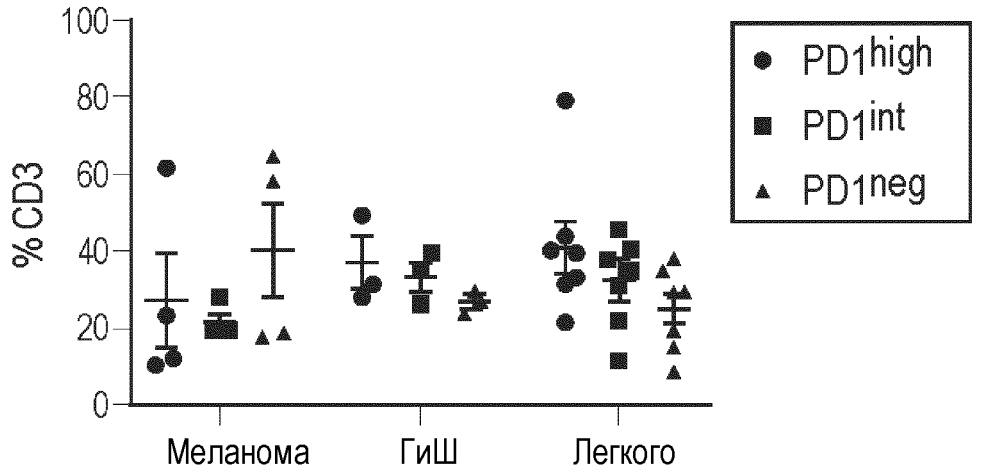
	L4096	L4097	L4089	L4100	L4101	L4104	L4106	H3035	H3037	H3038
%PD1^{High+}	20%	78%	31%	43%	32%	40%	39%	28%	49%	32%
Кол-во отсортир.	***10,700***	***62,500***	***20,303***	***46,000***	***99,000***	***70,000***	***20,600***	***25,000***	***25,000***	***3,000***
Высеяно в REP1	8,000	47,000	8,184	33,000	99,000	70,000	18,200	11,000	11,300	3,000
Выход PD1+ в REP1		1.08e7	1.22e7	1.77e7	99,000	1.2e8		3.85e6	ОТБРОШЕНО	
Кратность экспансии		229	1,493	536		1711		350		
Высеяно в REP2		1e5	1e5	1e5		1e5		1e5		
Выход PD1+ в REP2										
Кратность экспансии										
uCDR3										
Энтропия										
Общая часть (с общей массой)										

ФИГ. 128

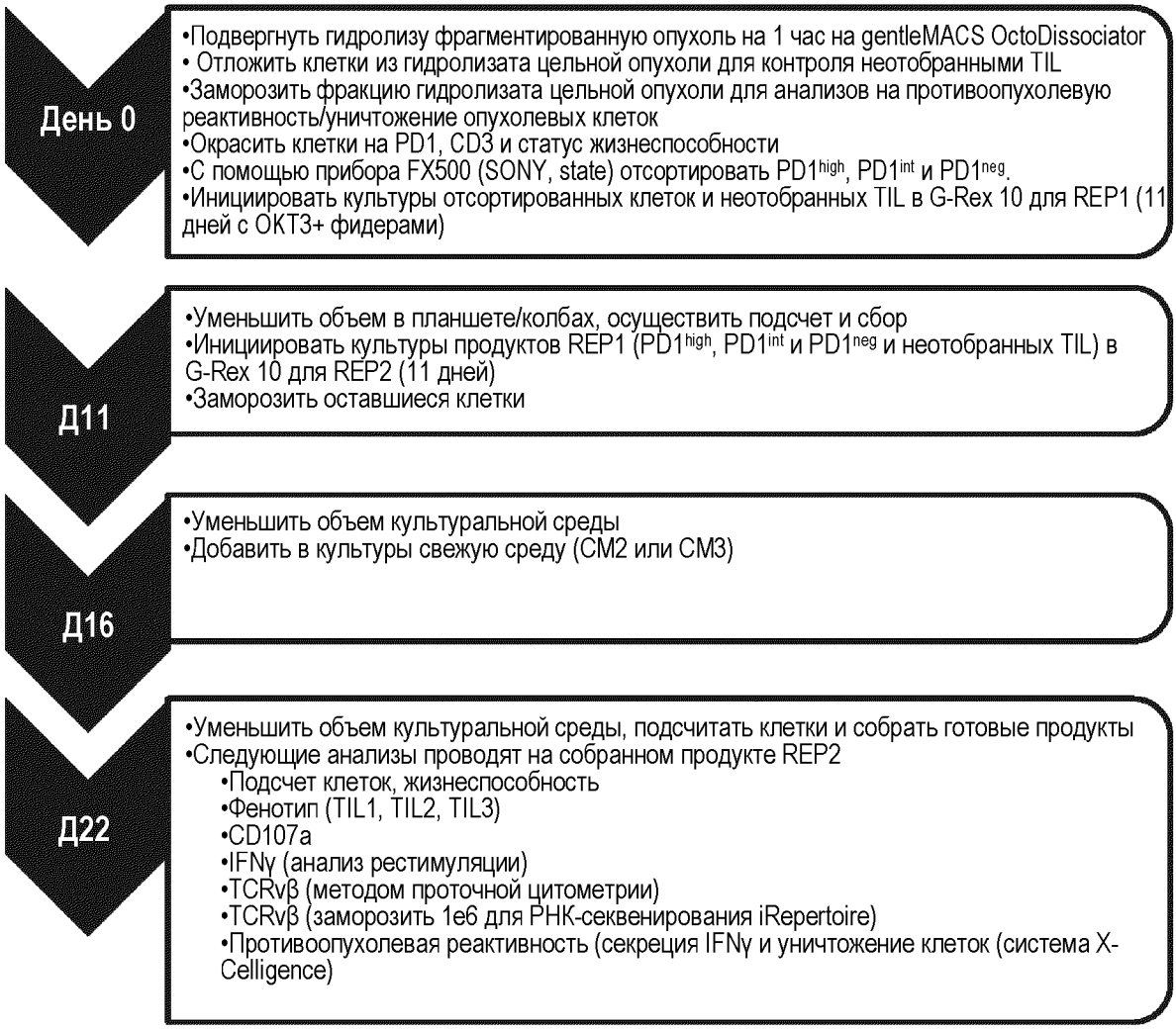
	M1132	M1136	M1139	M1141	OV8030
%PD1High+	12	61	24	11	41
Кол-во отсортир	***2,000***	***37,000***	***42,000***	***22,400***	***25,000***
Высеяно в REP1	2,000	23,500	10,200	22,400	21,800
Выход PD1+ в REP1	9.94e5	2.26e7	5.7e6		4.00e7
Кратность экспансии	49	961	556		1836
Высеяно в REP2	1e5	1e5	1e5		1e5
Выход PD1+ в REP2					
Кратность экспансии					
uCDR3					
Энтропия					
Общая часть (с общей массой)					

ФИГ. 129


100
80
60
40
20
0
% CD3
PD1high
PD1int
PDneg

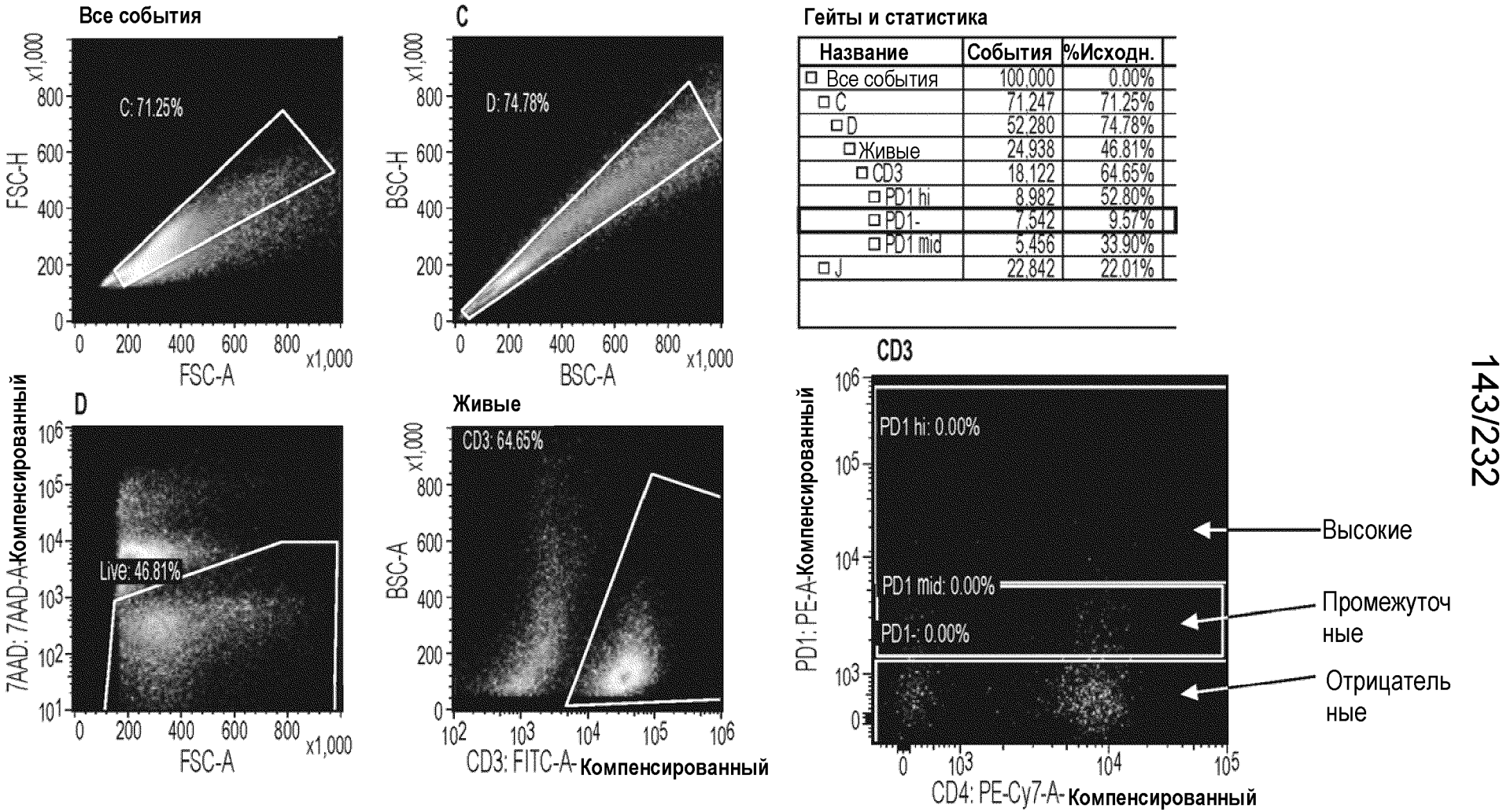

100
80
60
40
20
0
% CD3
Меланома
ГиШ
Легкого
PD1high
PD1int
PD1neg

ФИГ. 130

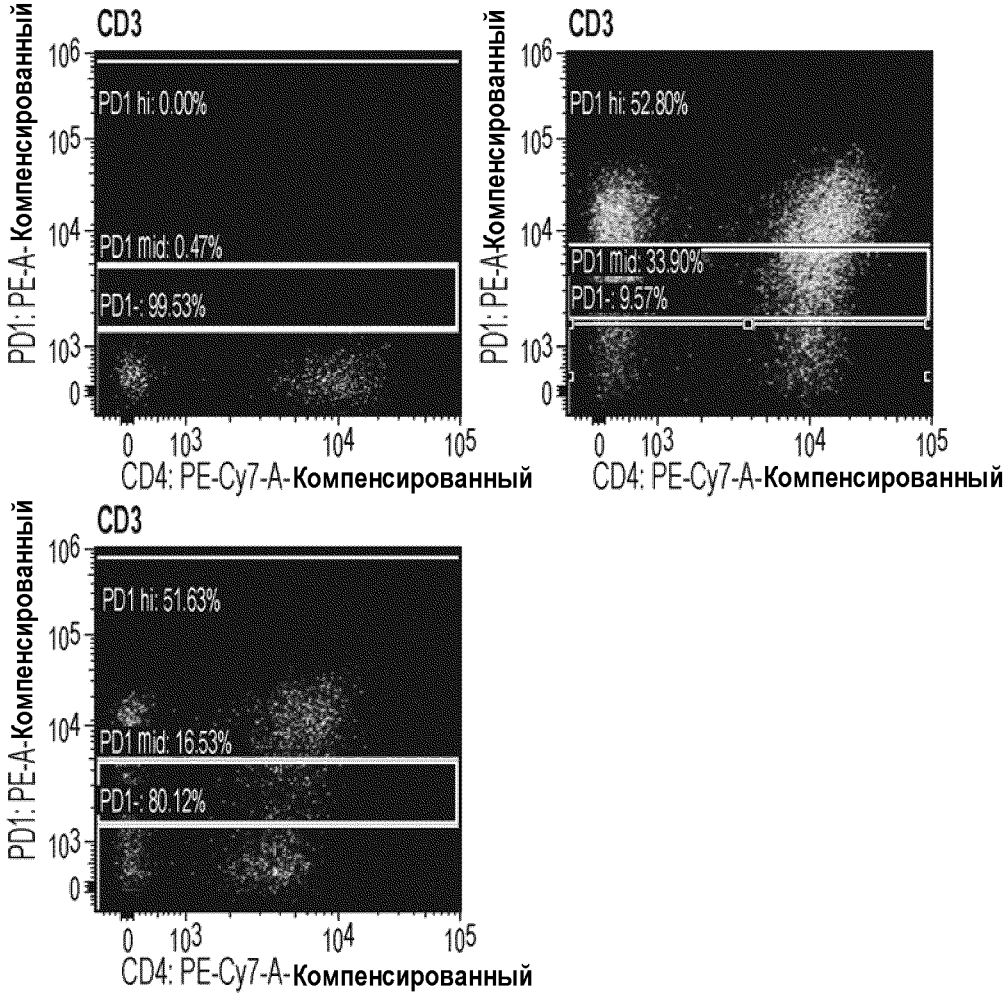

День 0
•Подвергнуть гидролизу фрагментированную опухоль на 1 час на gentleMACS OctoDissociator
• Отложить клетки из гидролизата цельной опухоли для контроля неотобранными TIL
•Заморозить фракцию гидролизата цельной опухоли для анализов на противоопухолевую реактивность/уничтожение опухолевых клеток
•Окрасить клетки на PD1, CD3 и статус жизнеспособности
•С помощью прибора FX500 (SONY, state) отсортировать PD1high, PD1int и PD1neg.
•Инициировать культуры отсортированных клеток и неотобранных TIL в G-Rex 10 для REP1 (11 дней с OKT3+ фидерами)
Д11
•Уменьшить объем в планшете/колбах, осуществить подсчет и сбор
•Инициировать культуры продуктов REP1 (PD1high, PD1int и PD1neg и неотобранных TIL) в G-Rex 10 для REP2 (11 дней)
•Заморозить оставшиеся клетки
Д16
•Уменьшить объем культуральной среды
•Добавить в культуры свежую среду (CM2 или CM3)
Д22
•Уменьшить объем культуральной среды, подсчитать клетки и собрать готовые продукты
•Следующие анализы проводят на собранном продукте REP2
•Подсчет клеток, жизнеспособность
•Фенотип (TIL1, TIL2, TIL3)
•CD107a
•IFNγ (анализ рестимуляции)
•TCRvβ (методом проточной цитометрии)
•TCRvβ (заморозить 1e6 для РНК-секвенирования iRepertoire)
•Противоопухолевая реактивность (секреция IFNγ и уничтожение клеток (система X-Celligence)

ФИГ. 131

Рабочий лист

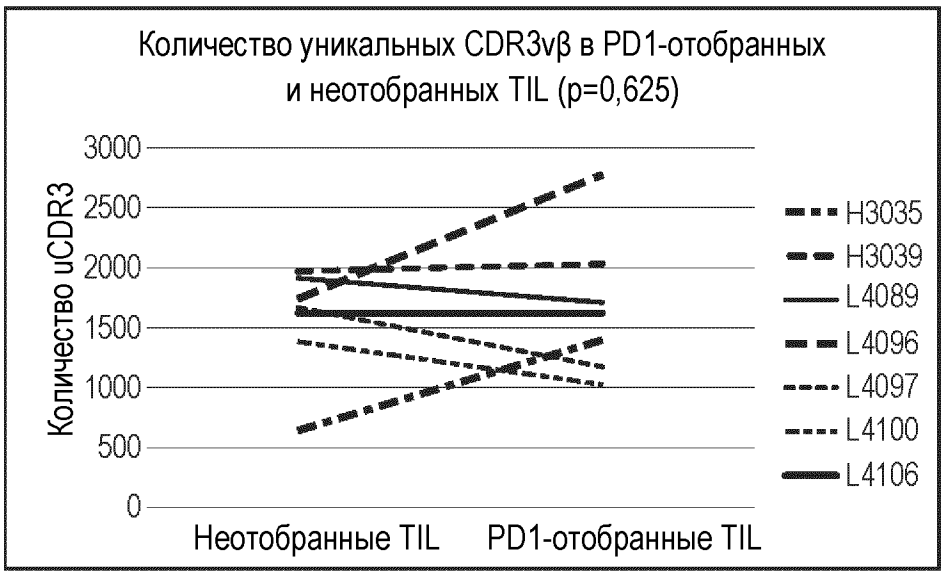


ФИГ. 132

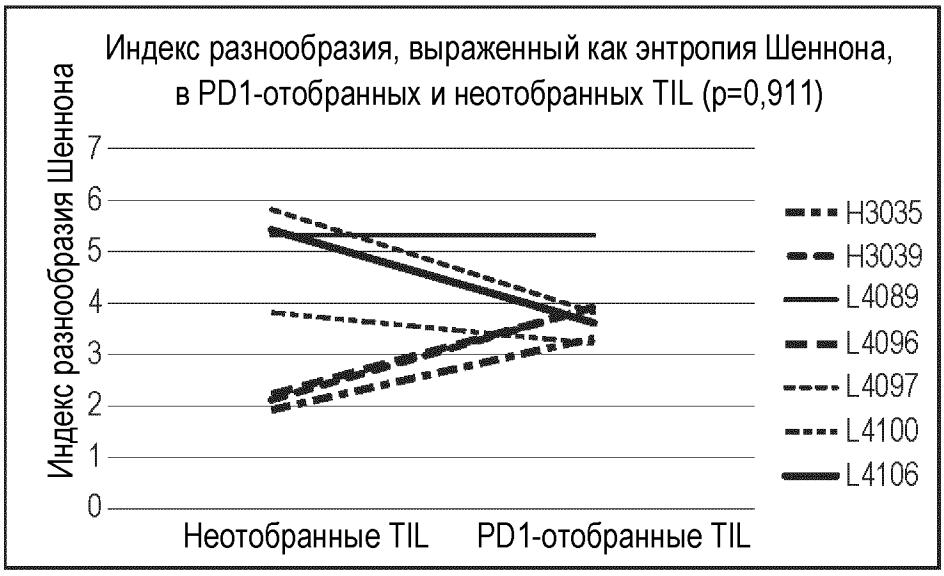

CD3
PD1 hi: 0.00%
PD1 mid: 0.47%
PD1-: 99.53%
PD1: PE-A-Компенсированный
CD4: PE-Cy7-A-Компенсированный
CD3
PD1 hi: 52.80%
PD1 mid: 33.90%
PD1-: 9.57%
PD1: PE-A-Компенсированный
CD4: PE-Cy7-A-Компенсированный
CD3
PD1 hi: 51.63%
PD1 mid: 16.53%
PD1-: 80.12%
PD1: PE-A-Компенсированный
CD4: PE-Cy7-A-Компенсированный

ФИГ. 133

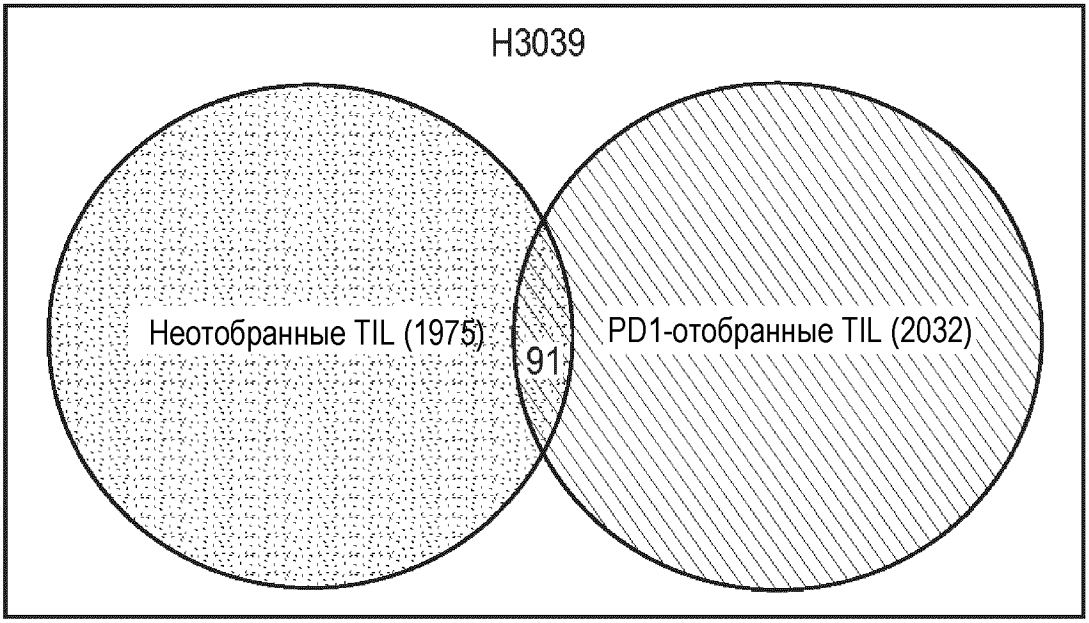
A.


Количество уникальных CDR3vβ в PD1-отобранных и неотобранных TIL (p=0,625)
Количество uCDR3
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
Неотобранные TIL
PD1-отобранные TIL
H3035
H3039
L4089
L4096
L4097
L4100
L4106

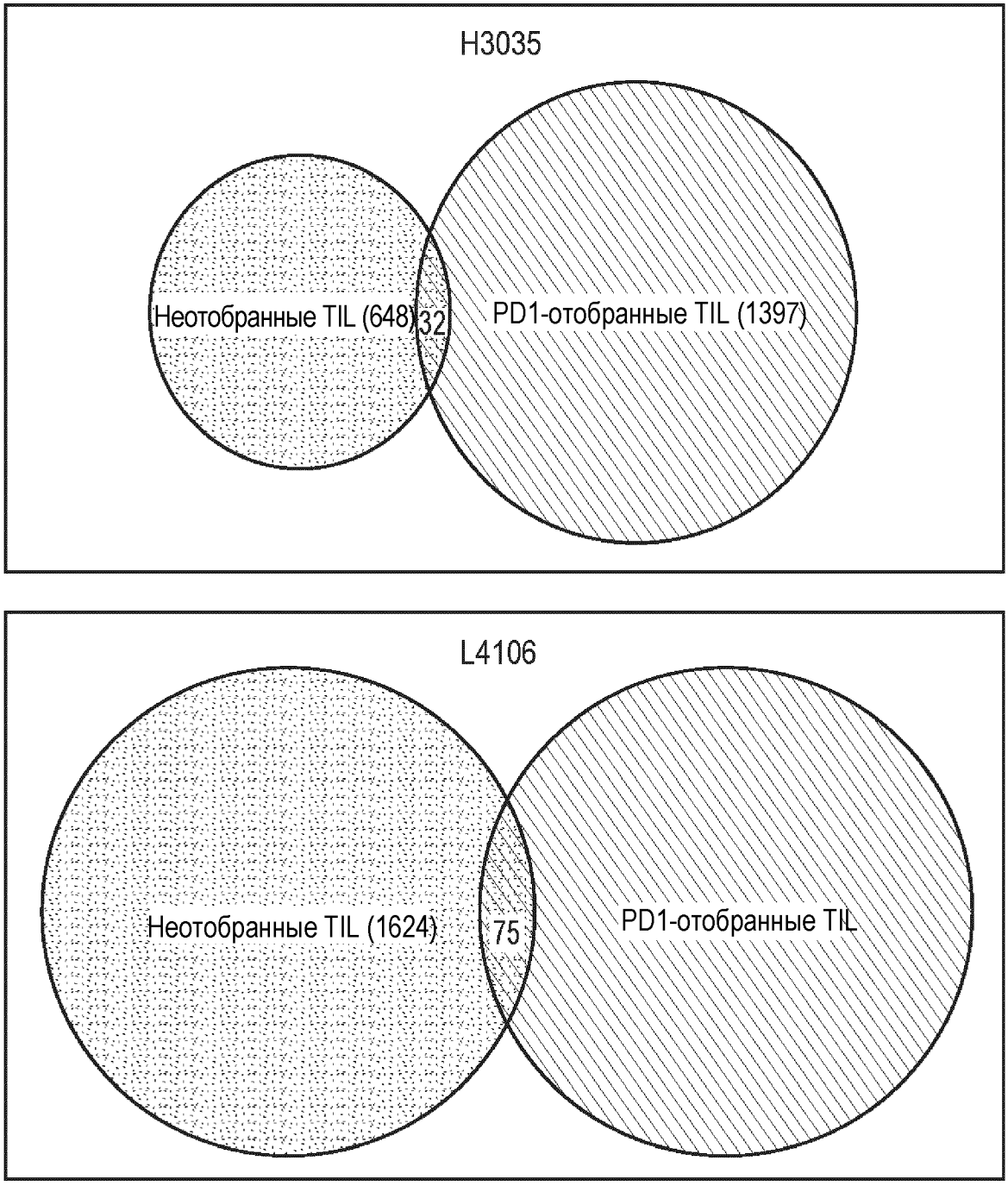
B.


Индекс разнообразия, выраженный как энтропия Шеннона, в PD1-отобранных и неотобранных TIL (p=0,911)
Индекс разнообразия Шеннона
7
6
5
4
3
2
1
0
Неотобранные TIL
PD1-отобранные TIL
H3035
H3039
L4089
L4096
L4097
L4100
L4106

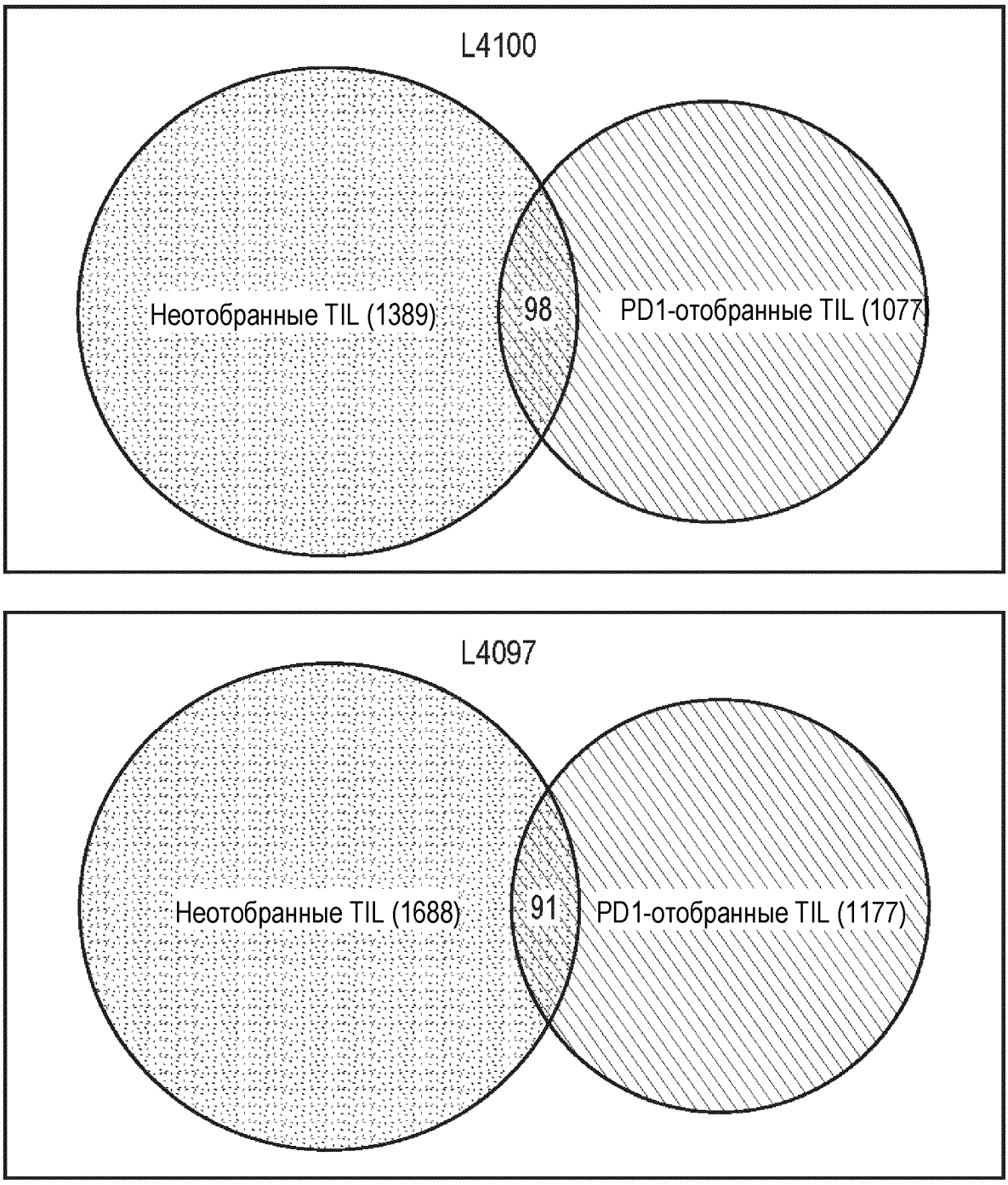
ФИГ. 134



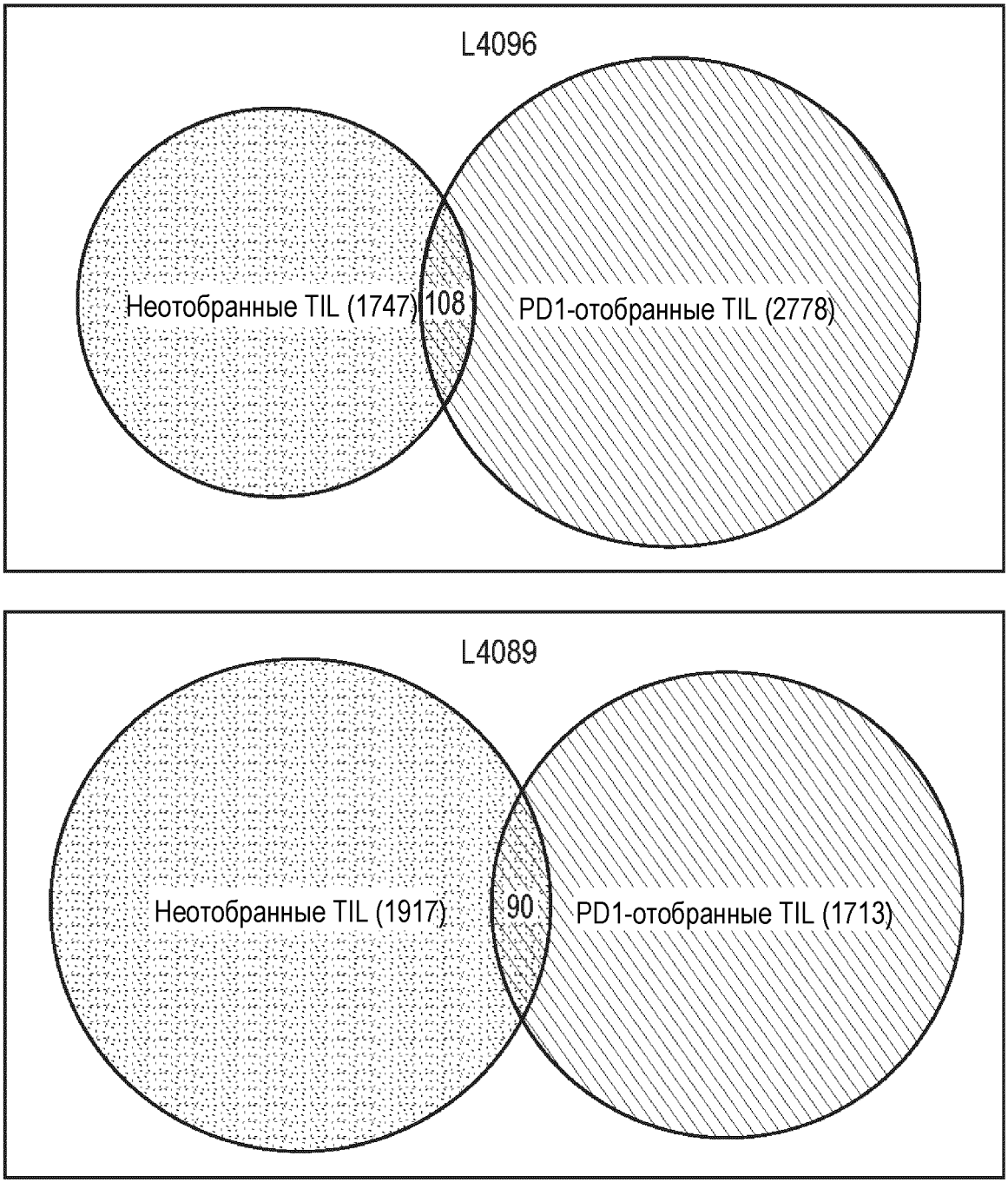
ФИГ. 135A


H3035
Неотобранные TIL (648)
32
PD1-отобранные TIL (1397)
L4106
Неотобранные TIL (1624)
75
PD1-отобранные TIL

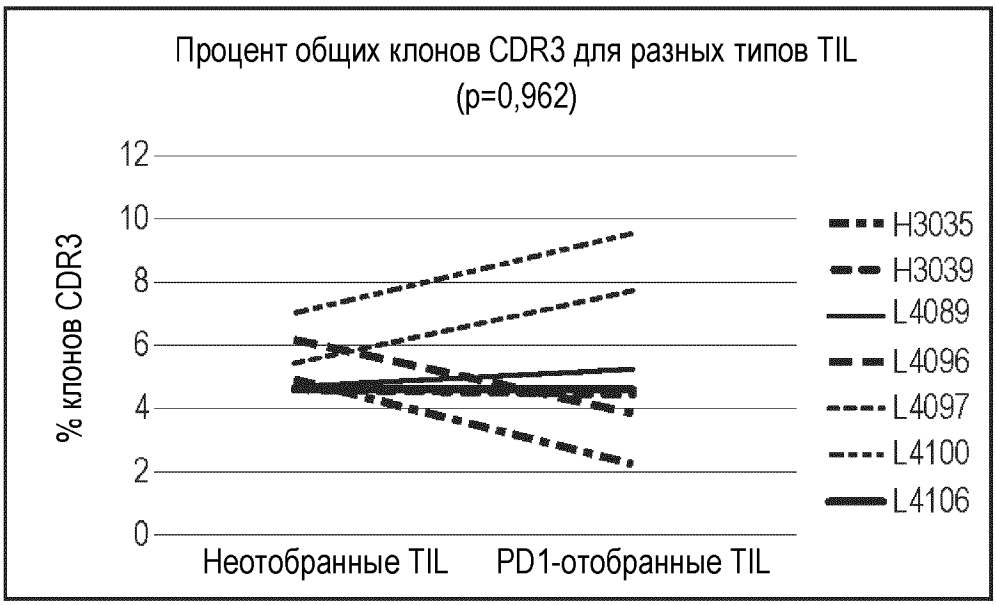
ФИГ. 135B

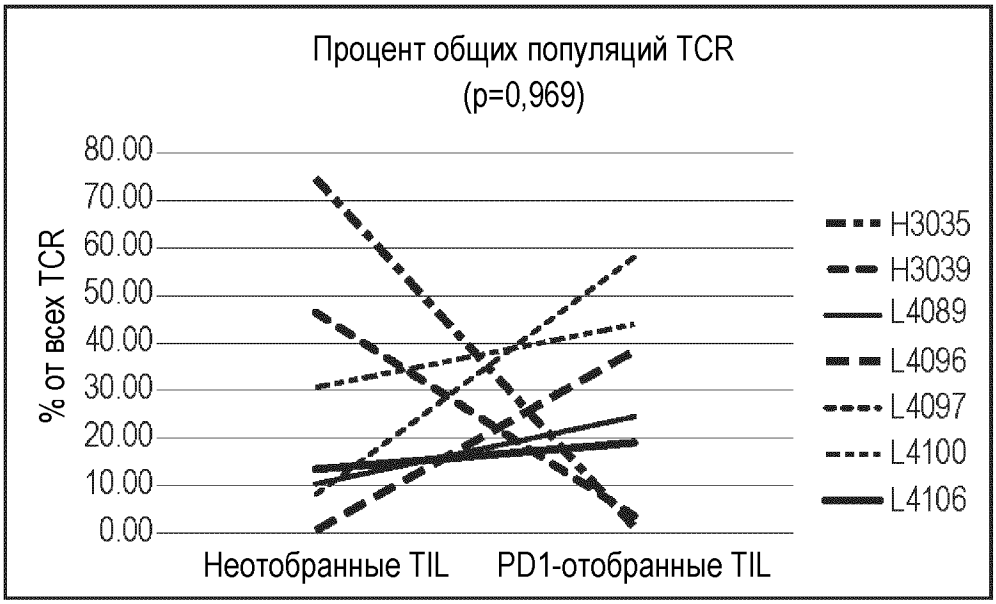

L4100
Неотобранные TIL (1389)
98
PD1-отобранные TIL (1077)
L4097
Неотобранные TIL (1688)
91
PD1-отобранные TIL (1177)

ФИГ. 135C

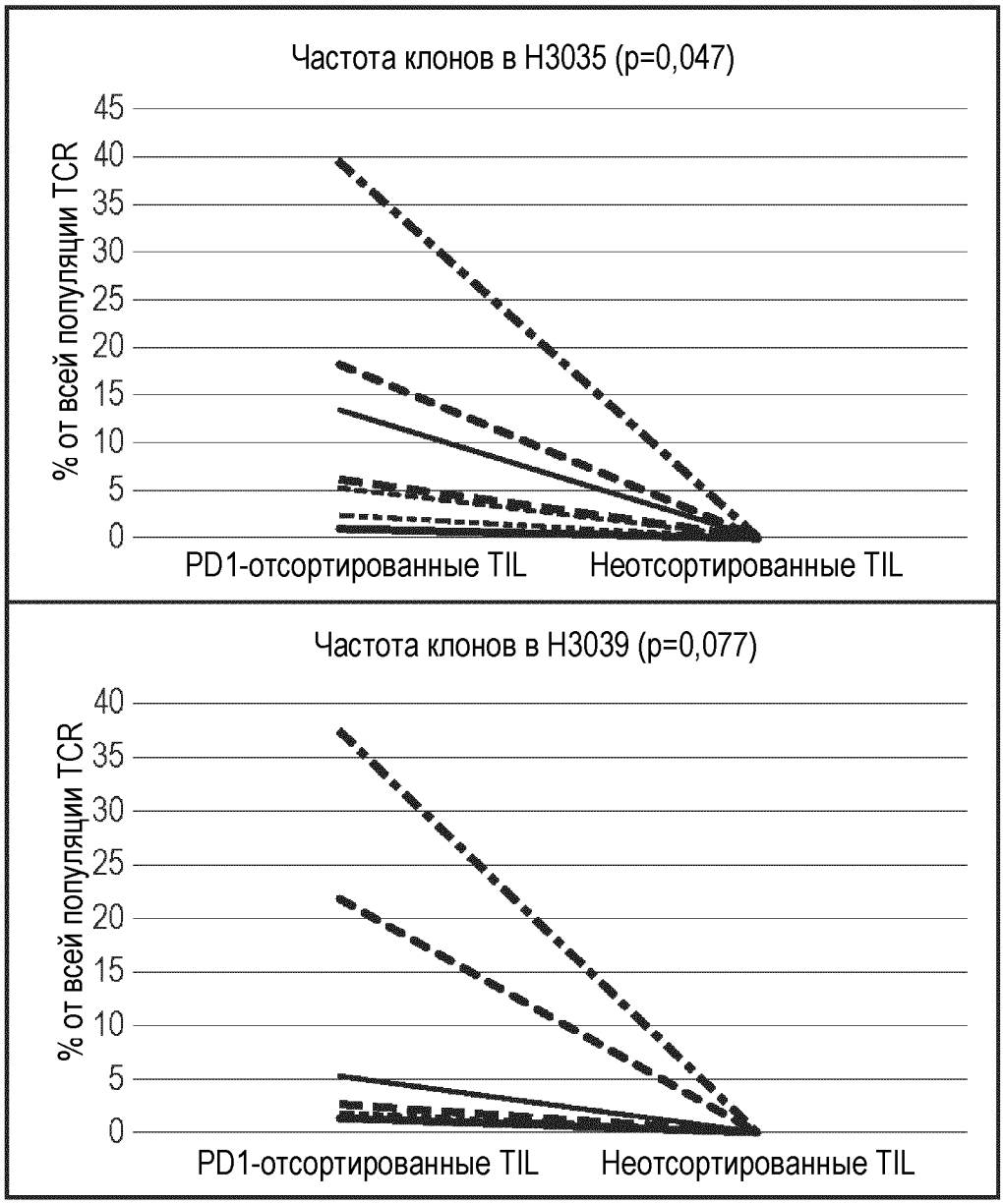

L4096
Неотобранные TIL (1747)
108
PD1-отобранные TIL (2778)
L4089
Неотобранные TIL (1917)
90
PD1-отобранные TIL (1713)

ФИГ. 135D

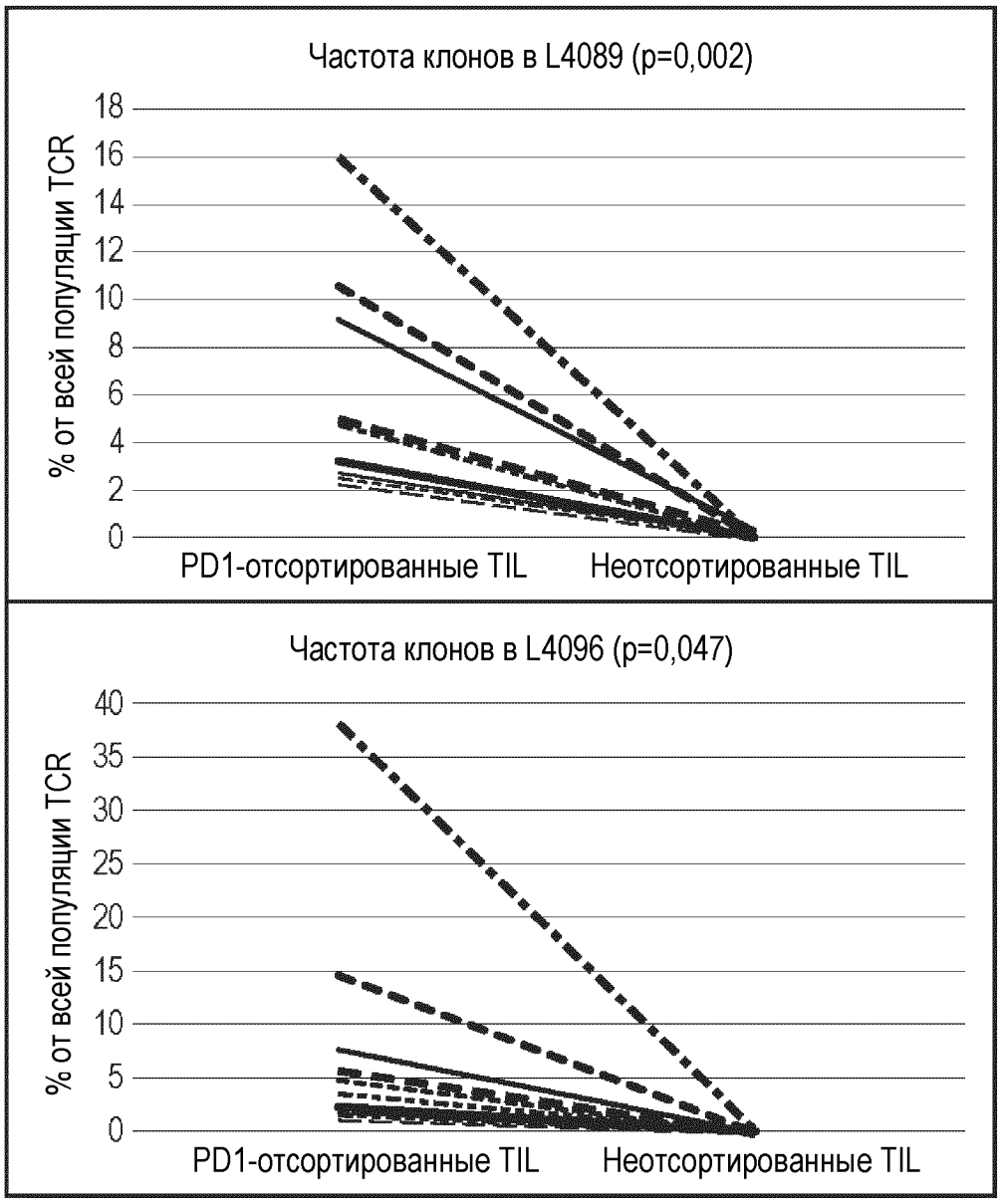

Процент общих клонов CDR3 для разных типов TIL
(p=0,962)
% клонов CDR3
12
10
8
6
4
2
0
Неотобранные TIL
PD1-отобранные TIL
H3035
H3039
L4089
L4096
L4097
L4100
L4106


Процент общих популяций TCR
(p=0,969)
% от всех TCR
80.00
70.00
60.00
50.00
40.00
30.00
20.00
10.00
0.00
Неотобранные TIL
PD1-отобранные TIL
H3035
H3039
L4089
L4096
L4097
L4100
L4106

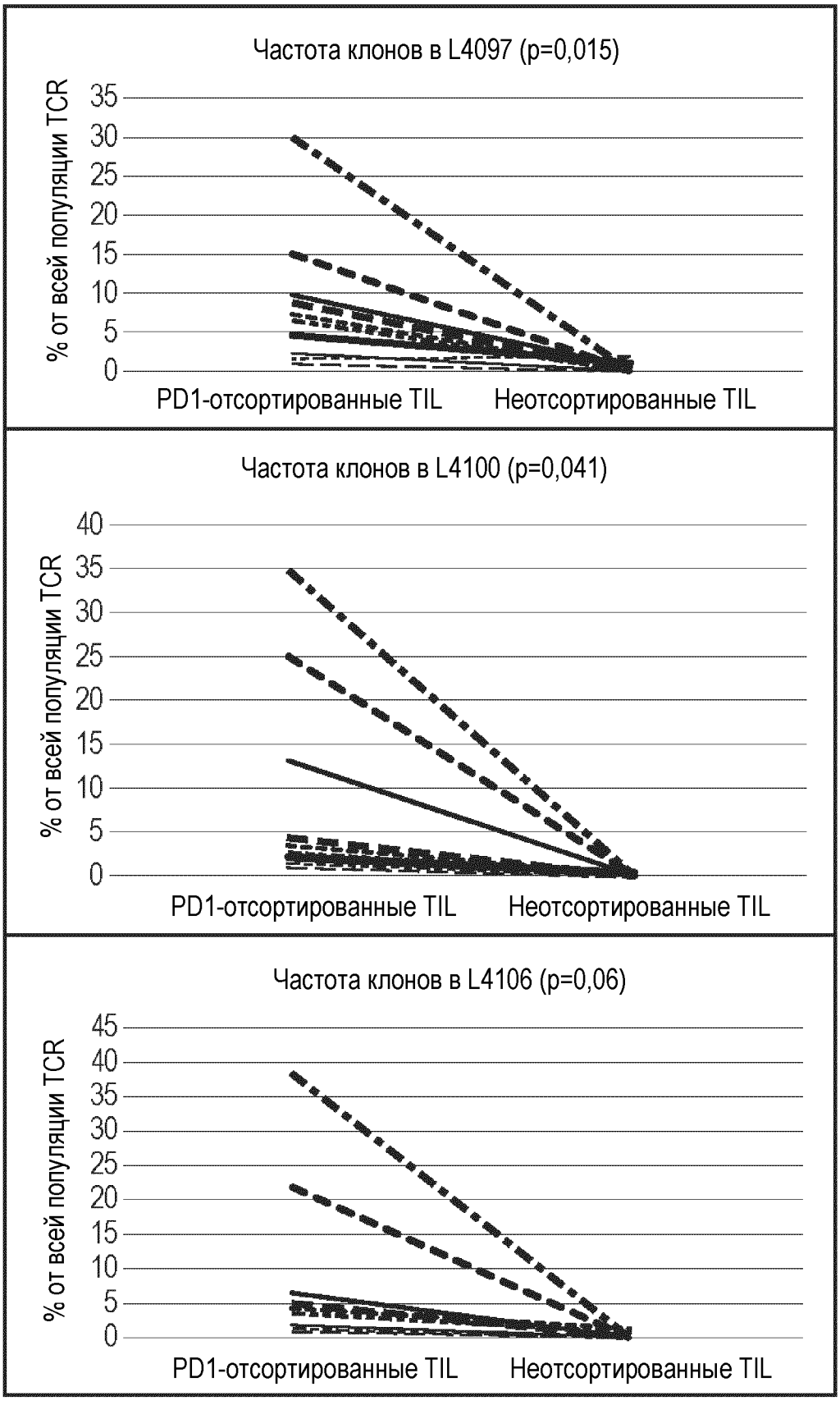
ФИГ. 135E


Частота клонов в H3035 (p=0,047)
% от всей популяции TCR
45
40
35
30
25
20
15
10
5
0
PD1-отсортированные TIL
Неотсортированные TIL
Частота клонов в H3039 (p=0,077)
% от всей популяции TCR
40
35
30
25
20
15
10
5
0
PD1-отсортированные TIL
Неотсортированные TIL

ФИГ. 136A


Частота клонов в L4089 (p=0,002)
% от всей популяции TCR
18
16
14
12
10
8
6
4
2
0
PD1-отсортированные TIL
Неотсортированные TIL
Частота клонов в L4096 (p=0,047)
% от всей популяции TCR
40
35
30
25
20
15
10
5
0
PD1-отсортированные TIL
Неотсортированные TIL

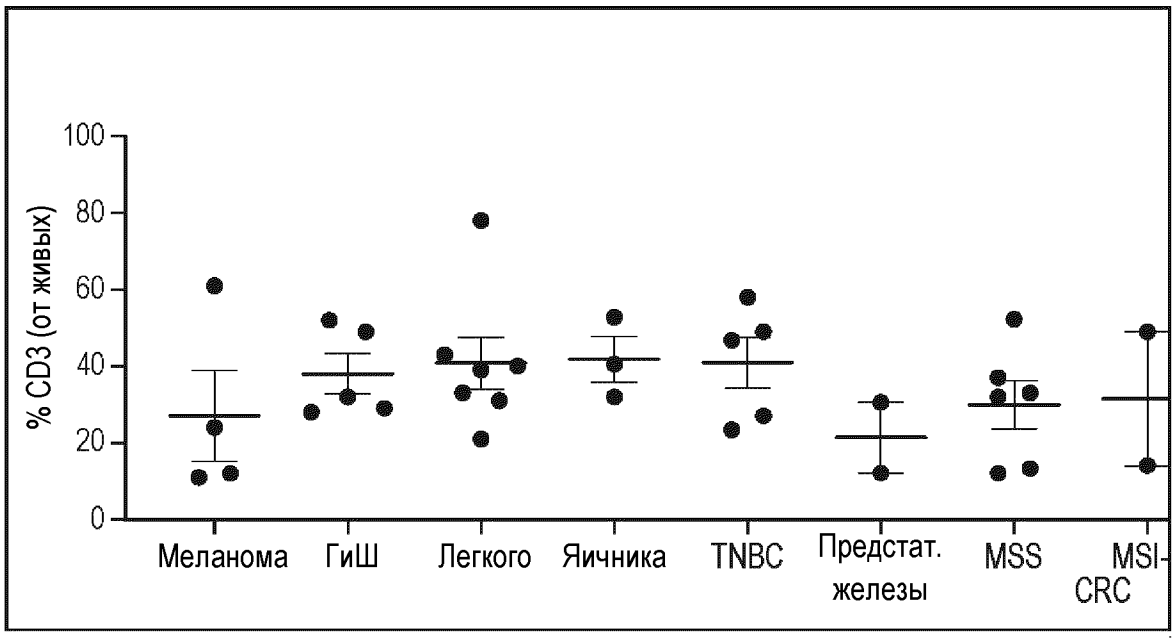
ФИГ. 136B


Частота клонов в L4097 (p=0,015)
% от всей популяции TCR
35
30
25
20
15
10
5
0
PD1-отсортированные TIL
Неотсортированные TIL
Частота клонов в L4100 (p=0,041)
% от всей популяции TCR
40
35
30
25
20
15
10
5
0
PD1-отсортированные TIL
Неотсортированные TIL
Частота клонов в L4106 (p=0,06)
% от всей популяции TCR
45
40
35
30
25
20
15
10
5
0
PD1-отсортированные TIL
Неотсортированные TIL

ФИГ. 136C

Идентификационный № опухоли	Гистология	Полученные PD1-отобранные TIL
H3035	ПКГШ	Да
H3036	ПКГШ	Нет Загрязненная культура
H3037	ПКГШ	Нет Загрязненная культура
H3038	ПКГШ	Да
H3039	ПКГШ	Да
L4089	НМРЛ	Да
L4096	НМРЛ	Да
L4097	НМРЛ	Да
L4100	НМРЛ	Да
L4101	НМРЛ	Да
L4104	НМРЛ	Да
L4106	НМРЛ	Да
M1132	Меланома	Да
M1136	Меланома	Да
M1139	Меланома	Да
M1141	Меланома	Да
OV8030	Яичника	Да
OV8042	Яичника	Да
OV8042	Яичника	Да
T6049	TNBC	Да
T6056	TNBC	Да
T6058	TNBC	Да
T6060	TNBC	Да
OC20019	Предстательной железы	Да
OC20030	Предстательной железы	Да
CC10026	CRC	Нет Плохой выход клеток гидролизата
CC10027	CRC	Нет Плохой выход клеток гидролизата
CC10028	CRC	Да
CC10029	CRC	Да
CC10031	CRC	Нет Загрязненная культура
CC10034	CRC	Да
CC10037	CRC	Да
CC10039	CRC	Да

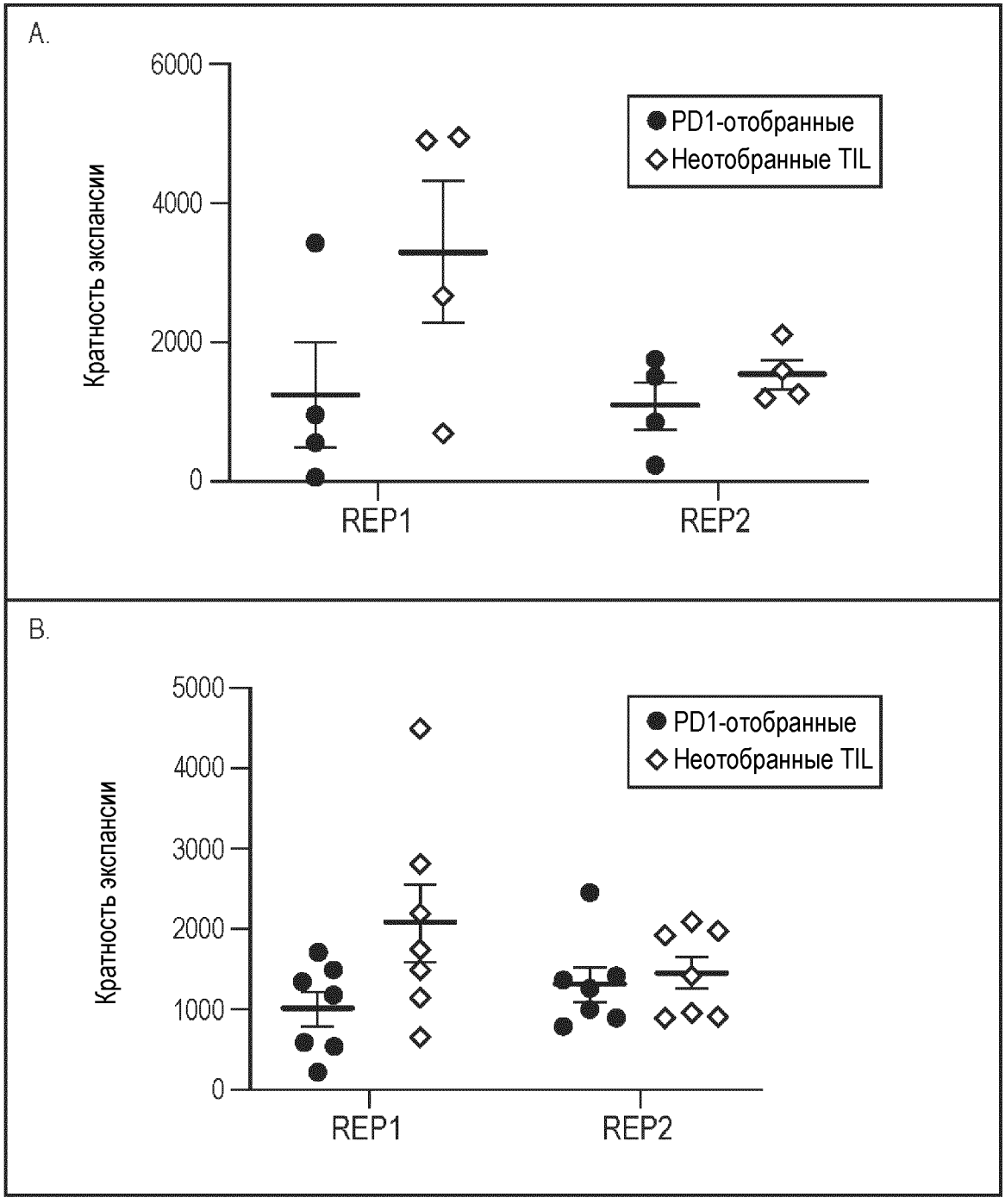
ФИГ. 137


% CD3 (от живых)
100
80
60
40
20
0
Меланома
ГиШ
Легкого
Яичника
TNBC
Предстат. железы
MSS
MSI-CRC

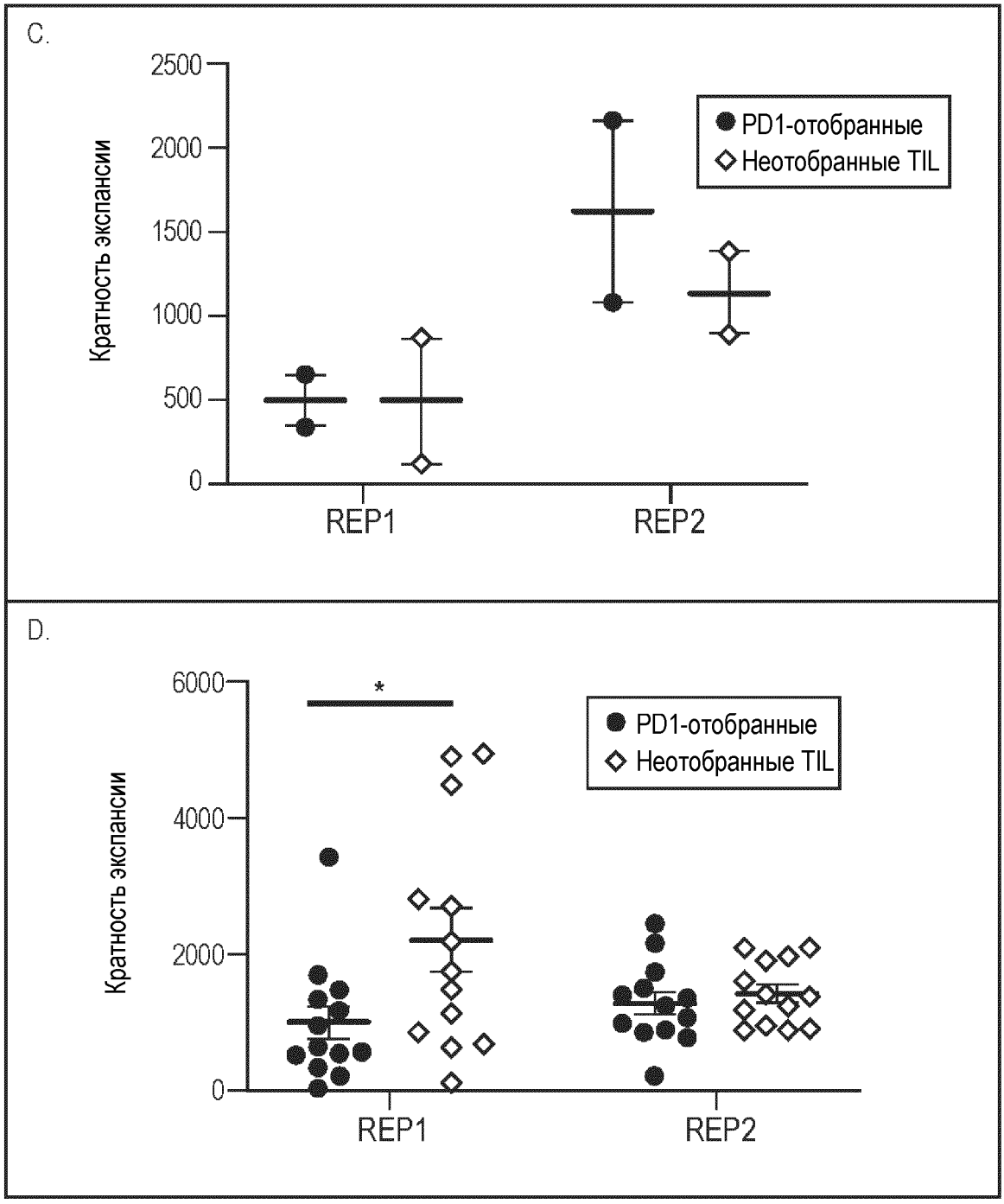
ФИГ. 138

Идентификационный № опухоли	Название образца	Гистология	Дата подготовки
H3035	PD1-отобранные TIL	ПКГШ	15.03.19
	Неотобранные TIL		
H3039	PD1-отобранные TIL	ПКГШ	09.04.19
	Неотобранные TIL		
L4089	PD1-отобранные TIL	НМРЛ	22.03.19
	Неотобранные TIL		
L4096	PD1-отобранные TIL	НМРЛ	04.04.19
	Неотобранные TIL		
L4097	PD1-отобранные TIL	НМРЛ	22.03.19
	Неотобранные TIL		
L4100	PD1-отобранные TIL	НМРЛ	26.03.19
	Неотобранные TIL		
L4101	PD1-отобранные TIL	НМРЛ	04.04.19
	Неотобранные TIL		
L4104	PD1-отобранные TIL	НМРЛ	26.03.19
	Неотобранные TIL		
L4106	PD1-отобранные TIL	НМРЛ	29.03.19
	Неотобранные TIL		
M1132	PD1-отобранные TIL	Меланома	26.03.19
	Неотобранные TIL		
M1136	PD1-отобранные TIL	Меланома	26.03.19
	Неотобранные TIL		
M1139	PD1-отобранные TIL	Меланома	22.03.19
	Неотобранные TIL		
M1141	PD1-отобранные TIL	Меланома	29.03.19
	Неотобранные TIL		

ФИГ. 139


A.
6000
4000
2000
0
Кратность экспансии
PD1-отобранные
Неотобранные TIL
REP1
REP2
B.
5000
4000
3000
2000
1000
0
Кратность экспансии
PD1-отобранные
Неотобранные TIL
REP1
REP2

ФИГ. 140


C.
2500
2000
1500
1000
500
0
Кратность экспансии
PD1-отобранные
Неотобранные TIL
REP1
REP2
D.
6000
4000
2000
0
*
Кратность экспансии
PD1-отобранные
Неотобранные TIL
REP1
REP2

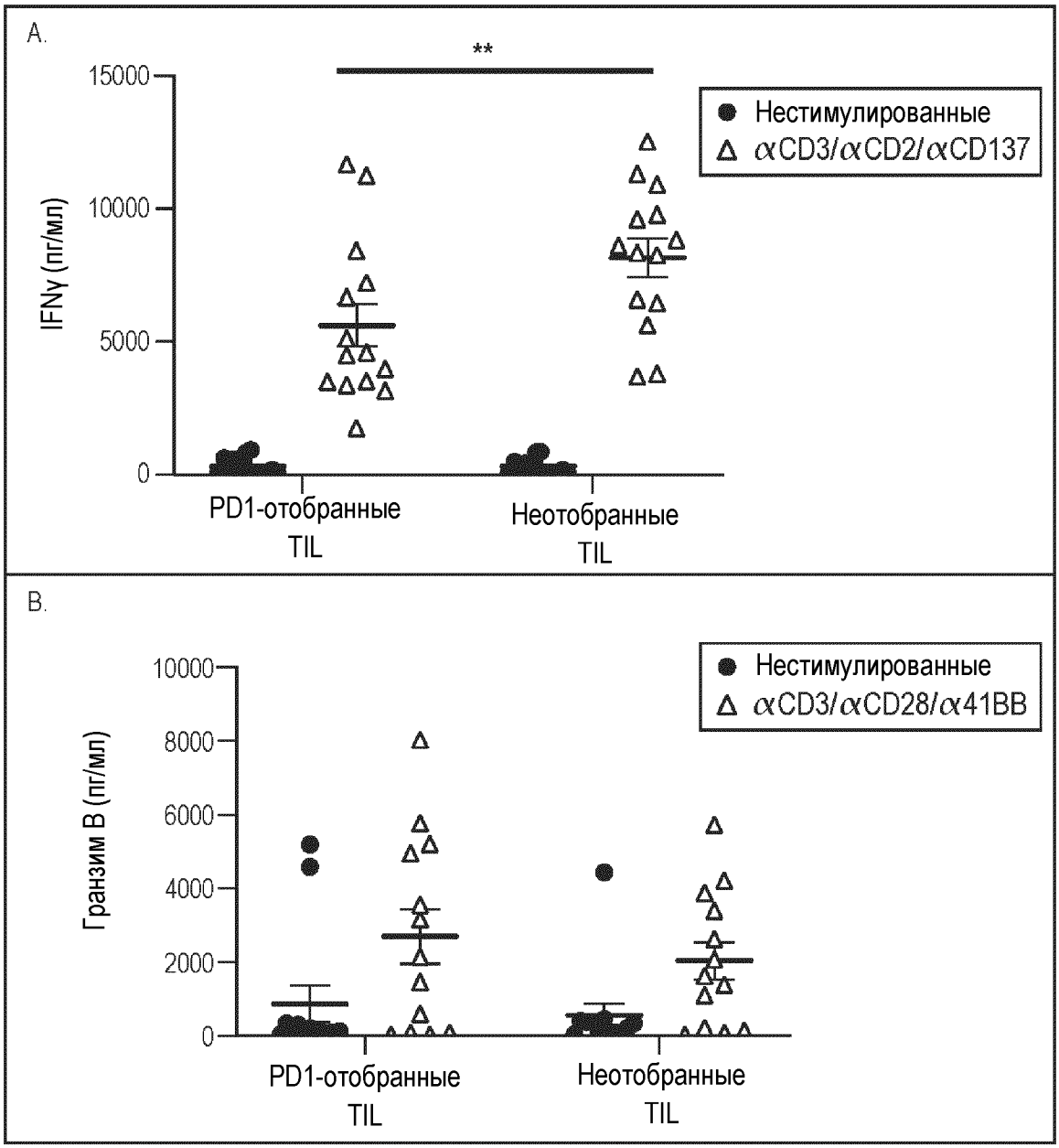
ФИГ. 140

Идентификационный № опухоли	Название образца	Гистология	REP1 Кратность Экспансии	REP2 Кратность Экспансии
H3035	PD-1-отобранные TIL	ПКГШ	350	2166
	Неотобранные TIL		869	1385
H3039	PD-1-отобранные TIL	ПКГШ	654	1082
	Неотобранные TIL		123	893
L4089	PD-1-отобранные TIL	НМРЛ	1502	2106
	Неотобранные TIL		2821	1416
L4096	PD-1-отобранные TIL	НМРЛ	582	788
	Неотобранные TIL		1749	919
L4097	PD-1-отобранные TIL	НМРЛ	230	1982
	Неотобранные TIL		1147	2455
L4100	PD-1-отобранные TIL	НМРЛ	536	997
	Неотобранные TIL		1498	900
L4101	PD-1-отобранные TIL	НМРЛ	1346	896
	Неотобранные TIL		2196	962
L4104	PD-1-отобранные TIL	НМРЛ	1711	1257
	Неотобранные TIL		649	1421
L4106	PD-1-отобранные TIL	НМРЛ	1179	1367
	Неотобранные TIL		4500	1912
M1132	PD-1-отобранные TIL	Меланома	50	234
	Неотобранные TIL		2670	1263
M1136	PD-1-отобранные TIL	Меланома	961	867
	Неотобранные TIL		693	1190
M1139	PD-1-отобранные TIL	Меланома	557	1751
	Неотобранные TIL		4908	1613
M1141	PD-1-отобранные TIL	Меланома	3429	1515
	Неотобранные TIL		4950	2107

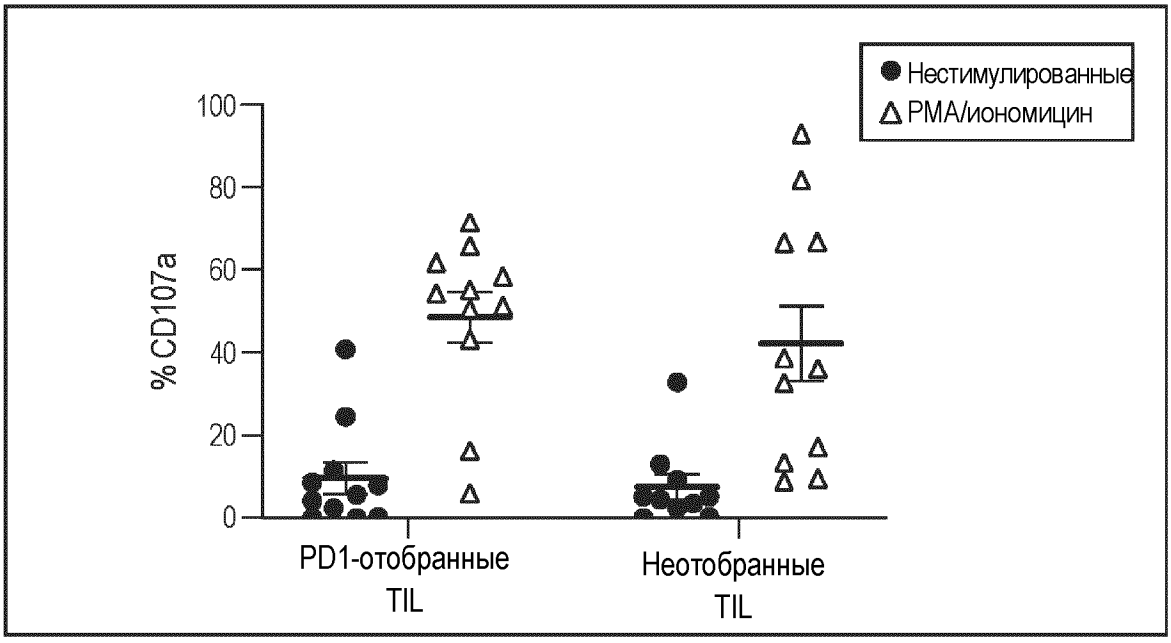
ФИГ. 141

Идентификационный № опухоли	Название образца	Гистология	REP1 Кратность Экспансии	REP2 Кратность Экспансии
H3035	PD-1-отобранные TIL	ПКГШ	350	2166
	Неотобранные TIL		869	1385
H3039	PD-1-отобранные TIL	ПКГШ	654	1082
	Неотобранные TIL		123	893
L4089	PD-1-отобранные TIL	НМРЛ	1502	2106
	Неотобранные TIL		2821	1416
L4096	PD-1-отобранные TIL	НМРЛ	582	788
	Неотобранные TIL		1749	919
L4097	PD-1-отобранные TIL	НМРЛ	230	1982
	Неотобранные TIL		1147	2455
L4100	PD-1-отобранные TIL	НМРЛ	536	997
	Неотобранные TIL		1498	900
L4101	PD-1-отобранные TIL	НМРЛ	1346	896
	Неотобранные TIL		2196	962
L4104	PD-1-отобранные TIL	НМРЛ	1711	1257
	Неотобранные TIL		649	1421
L4106	PD-1-отобранные TIL	НМРЛ	1179	1367
	Неотобранные TIL		4500	1912
M1132	PD-1-отобранные TIL	Меланома	50	234
	Неотобранные TIL		2670	1263
M1136	PD-1-отобранные TIL	Меланома	961	867
	Неотобранные TIL		693	1190
M1139	PD-1-отобранные TIL	Меланома	557	1751
	Неотобранные TIL		4908	1613
M1141	PD-1-отобранные TIL	Меланома	3429	1515
	Неотобранные TIL		4950	2107

ФИГ. 142


A.
**
15000
10000
5000
0
IFNγ (пг/мл)
Нестимулированные
αCD3/αCD2/αCD137
PD1-отобранные TIL
Неотобранные TIL
B.
10000
8000
6000
4000
2000
0
Гранзим B (пг/мл)
Нестимулированные
αCD3/αCD28/α41BB
PD1-отобранные TIL
Неотобранные TIL

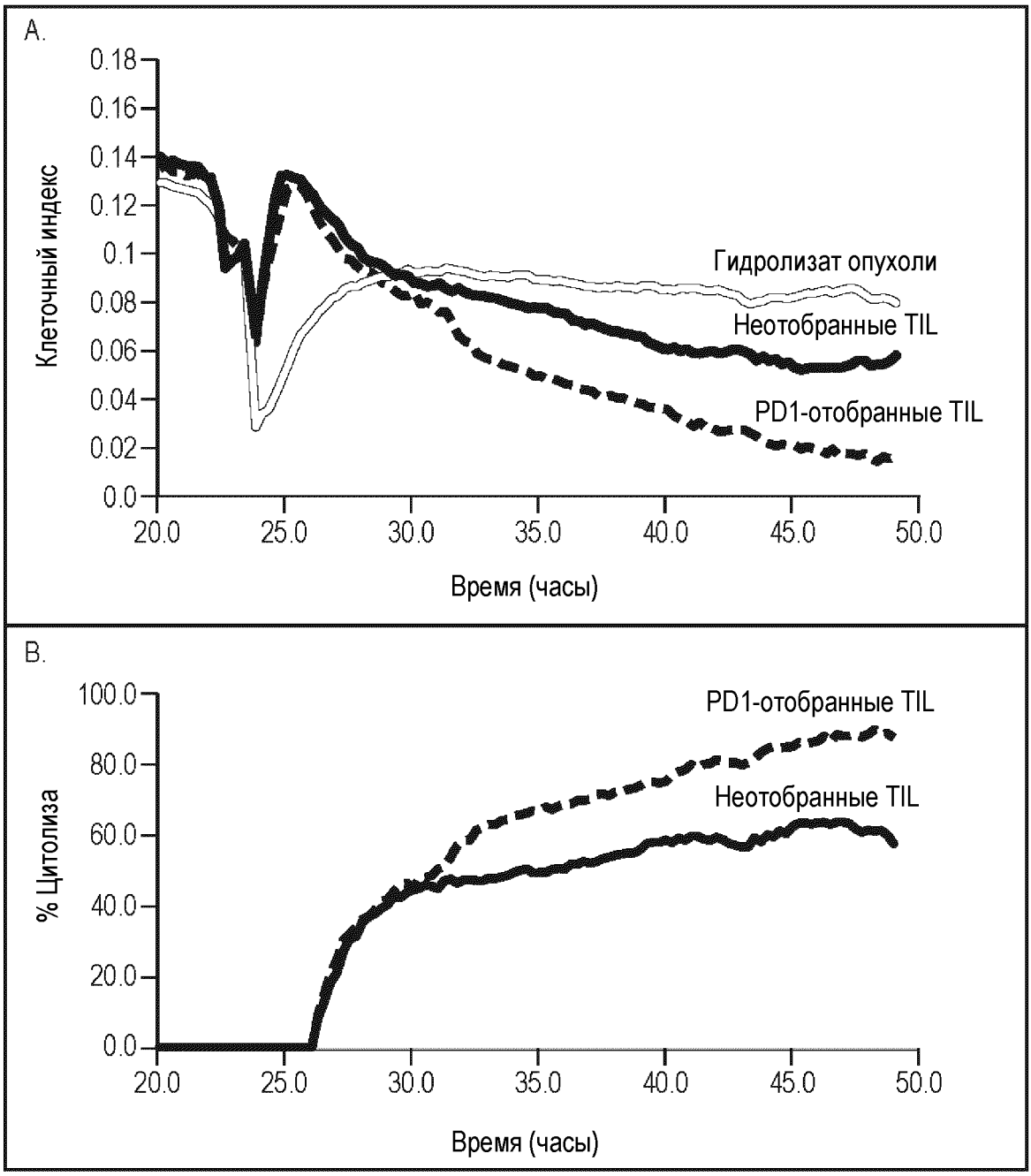
ФИГ. 143


Нестимулированные
PMA/иономицин
% CD107a
100
80
60
40
20
0
PD1-отобранные TIL
Неотобранные TIL

ФИГ. 144

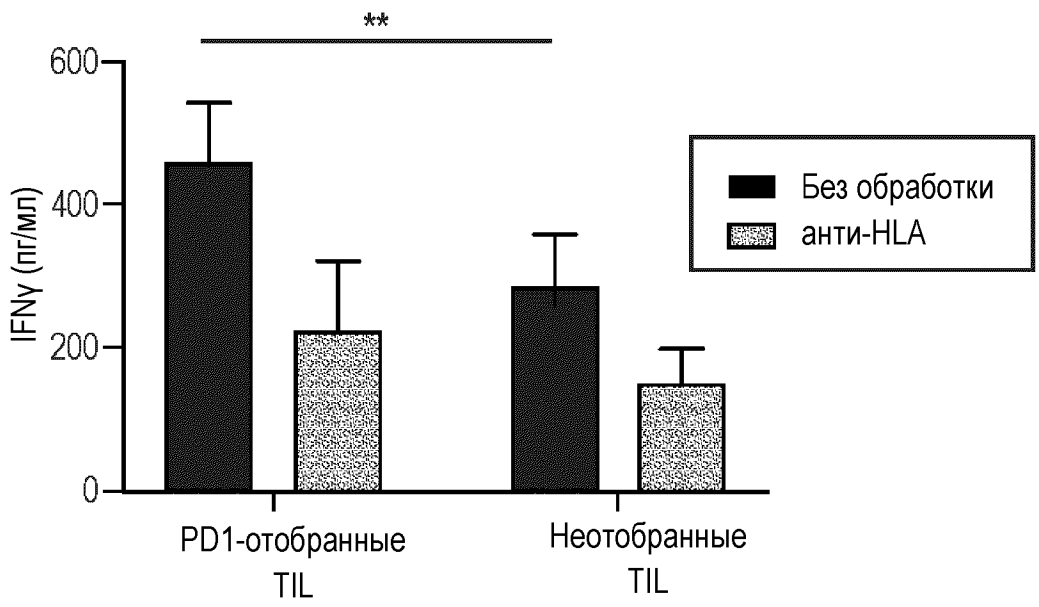
Идентификационный № опухоли	Название образца	Гистология	Дата подготовки	REP1 Кратность Экспансии	REP2 Кратность Экспансии
H3035	PD-1-отобранные TIL	ПКГШ	15.03.19	350	2166
	Неотобранные TIL			869	1385
H3039	PD-1-отобранные TIL	ПКГШ	09.04.19	654	1082
	Неотобранные TIL			123	893
L4089	PD-1-отобранные TIL	НМРЛ	22.03.19	1502	2106
	Неотобранные TIL			2821	1416
L4096	PD-1-отобранные TIL	НМРЛ	04.04.19	582	788
	Неотобранные TIL			1749	919
L4097	PD-1-отобранные TIL	НМРЛ	22.03.19	230	1982
	Неотобранные TIL			1147	2455
L4100	PD-1-отобранные TIL	НМРЛ	26.03.19	536	997
	Неотобранные TIL			1498	900
L4101	PD-1-отобранные TIL	НМРЛ	04.04.19	1346	896
	Неотобранные TIL			2196	962100
L4104	PD-1-отобранные TIL	НМРЛ			
	Неотобранные TIL				
L4106	PD-1-отобранные TIL	НМРЛ	29.03.19	1179	1367
	Неотобранные TIL			4500	1912
M1132	PD-1-отобранные TIL	Меланома	26.03.19	50	234
	Неотобранные TIL			2670	1263
M1136	PD-1-отобранные TIL	Меланома	26.03.19	961	867
	Неотобранные TIL			693	1190
M1139	PD-1-отобранные TIL	Меланома	22.03.19	557	1751
	Неотобранные TIL			4908	1613
M1141	PD-1-отобранные TIL	Меланома	29.03.19	3429	1515
	Неотобранные TIL			4950	2107

ФИГ. 145


A.
Клеточный индекс
0.18
0.16
0.14
0.12
0.1
0.08
0.06
0.04
0.02
0.0
20.0
25.0
30.0
35.0
40.0
45.0
50.0
Время (часы)
Гидролизат опухоли
Неотобранные TIL
PD1-отобранные TIL
B.
% Цитолиза
100.0
80.0
60.0
40.0
20.0
0.0
20.0
25.0
30.0
35.0
40.0
45.0
50.0
Время (часы)
PD1-отобранные TIL
Неотобранные TIL

ФИГ. 146

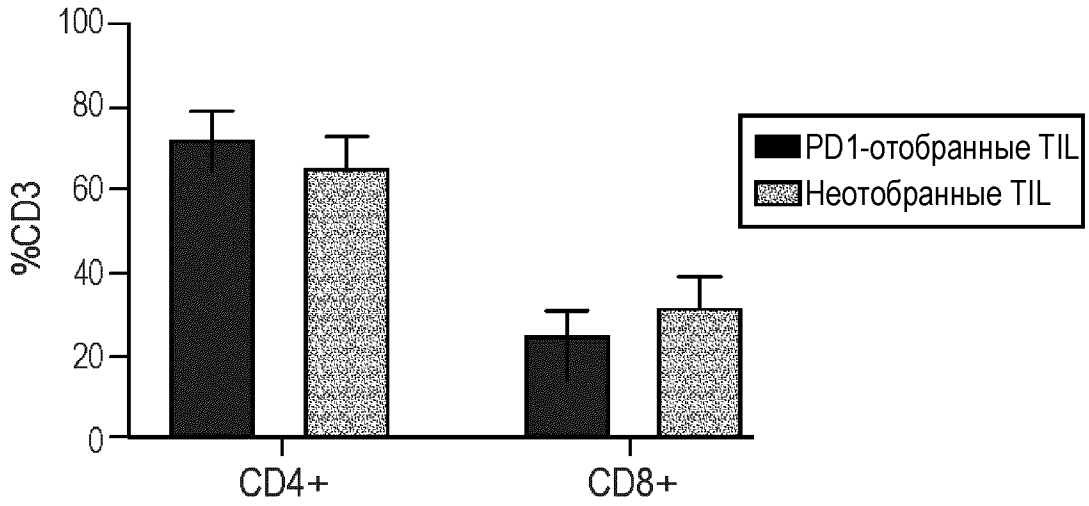
C


**
600
400
200
0
IFNγ (пг/мл)
Без обработки
анти-HLA
PD1-отобранные TIL
Неотобранные TIL

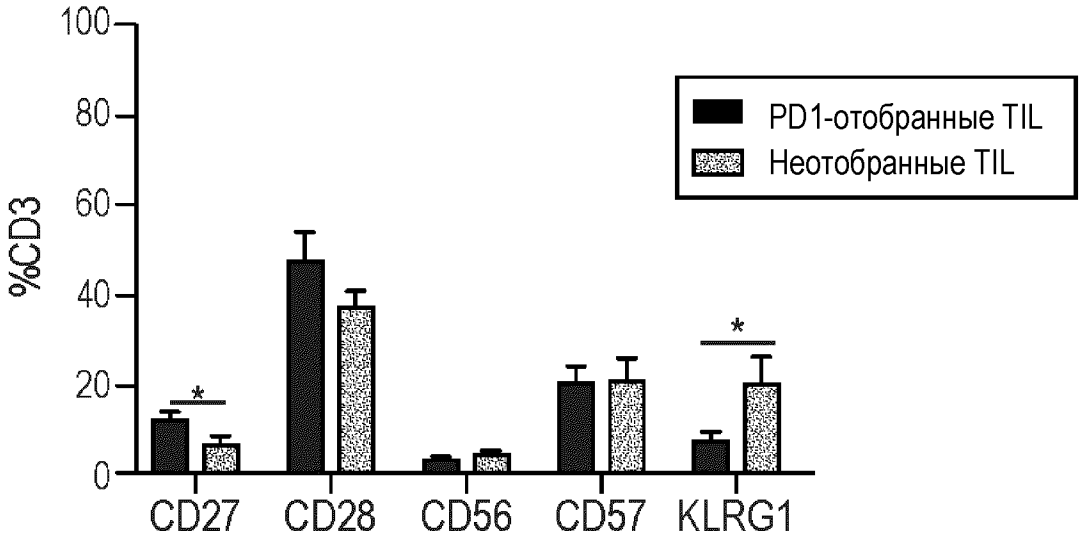
ФИГ. 146C

Идентификационный № опухоли	Название образца	Гистология	REP1 Кратность Экспансии	REP2 Кратность Экспансии
H3035	PD-1-отобранные TIL	ПКГШ	350	2166
	Неотобранные TIL		869	1385
H3039	PD-1-отобранные TIL	ПКГШ	654	1082
	Неотобранные TIL		123	893
L4089	PD-1-отобранные TIL	НМРЛ	1502	2106
	Неотобранные TIL		2821	1416
L4096	PD-1-отобранные TIL	НМРЛ	582	788
	Неотобранные TIL		1749	919
L4097	PD-1-отобранные TIL	НМРЛ	230	1982
	Неотобранные TIL		1147	2455
L4100	PD-1-отобранные TIL	НМРЛ	536	997
	Неотобранные TIL		1498	900
L4101	PD-1-отобранные TIL	НМРЛ	1346	896
	Неотобранные TIL		2196	962
L4104	PD-1-отобранные TIL	НМРЛ	1711	1257
	Неотобранные TIL		649	1421
L4106	PD-1-отобранные TIL	НМРЛ	1179	1367
	Неотобранные TIL		4500	1912
M1132	PD-1-отобранные TIL	Меланома	50	234
	Неотобранные TIL		2670	1263
M1136	PD-1-отобранные TIL	Меланома	961	867
	Неотобранные TIL		693	1190
M1139	PD-1-отобранные TIL	Меланома	557	1751
	Неотобранные TIL		4908	1613
M1141	PD-1-отобранные TIL	Меланома	3429	1515
	Неотобранные TIL		4950	2107

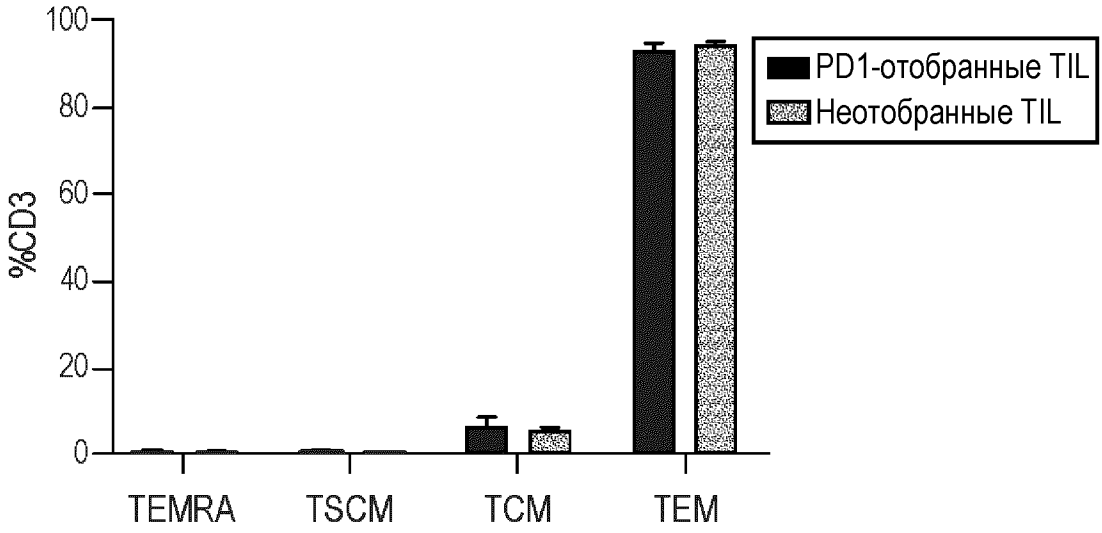
ФИГ. 147


100
80
60
40
20
0
%CD3
CD4+
CD8+
PD1-отобранные TIL
Неотобранные TIL

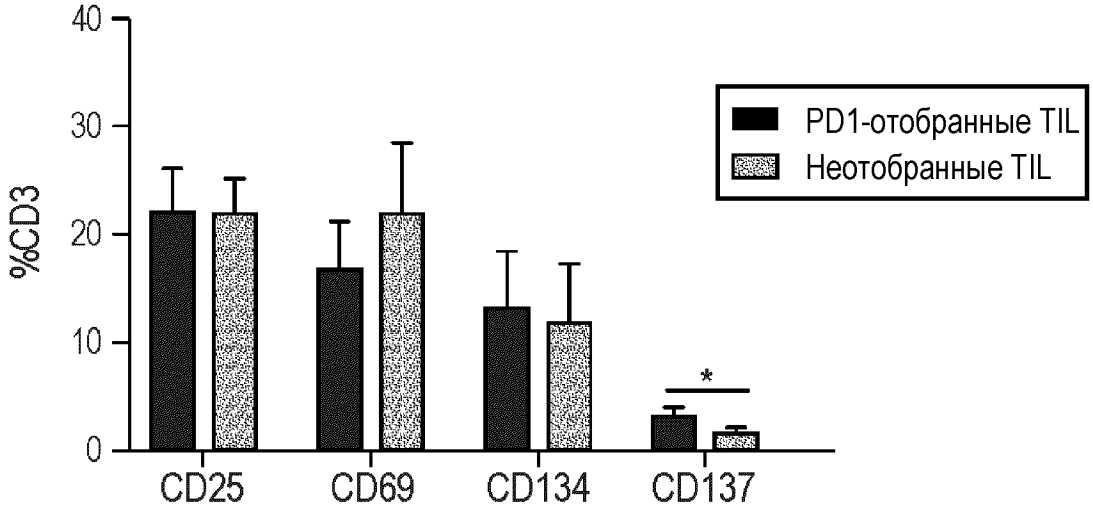
ФИГ. 148


100
80
60
40
20
0
%CD3
*
*
CD27
CD28
CD56
CD57
KLRG1
PD1-отобранные TIL
Неотобранные TIL

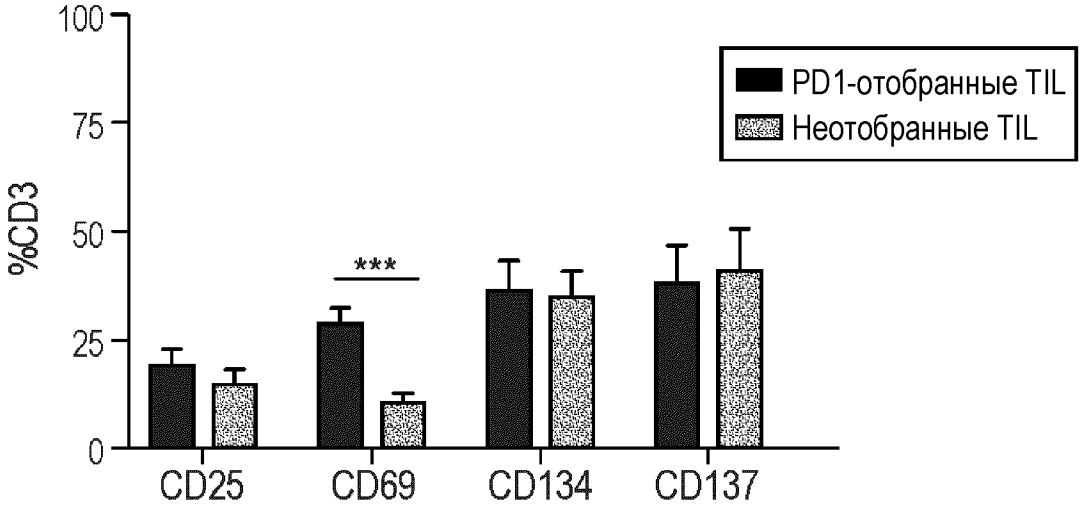
ФИГ. 149


100
80
60
40
20
0
%CD3
TEMRA
TSCM
TCM
TEM
PD1-отобранные TIL
Неотобранные TIL

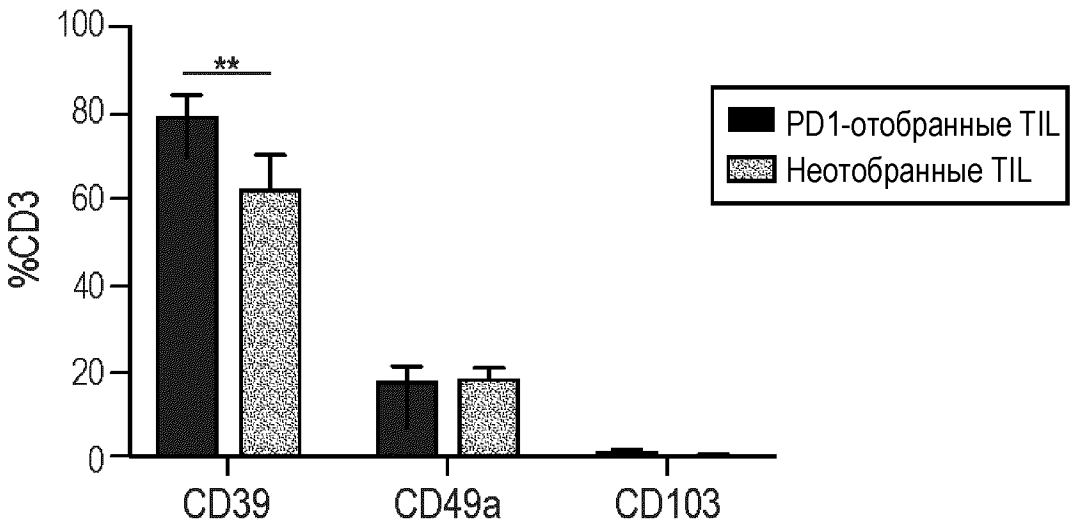
ФИГ. 150


40
30
20
10
0
%CD3
PD1-отобранные TIL
Неотобранные TIL
*
CD25
CD69
CD134
CD137

ФИГ. 151


100
75
50
25
0
%CD3
***
PD1-отобранные TIL
Неотобранные TIL
CD25
CD69
CD134
CD137

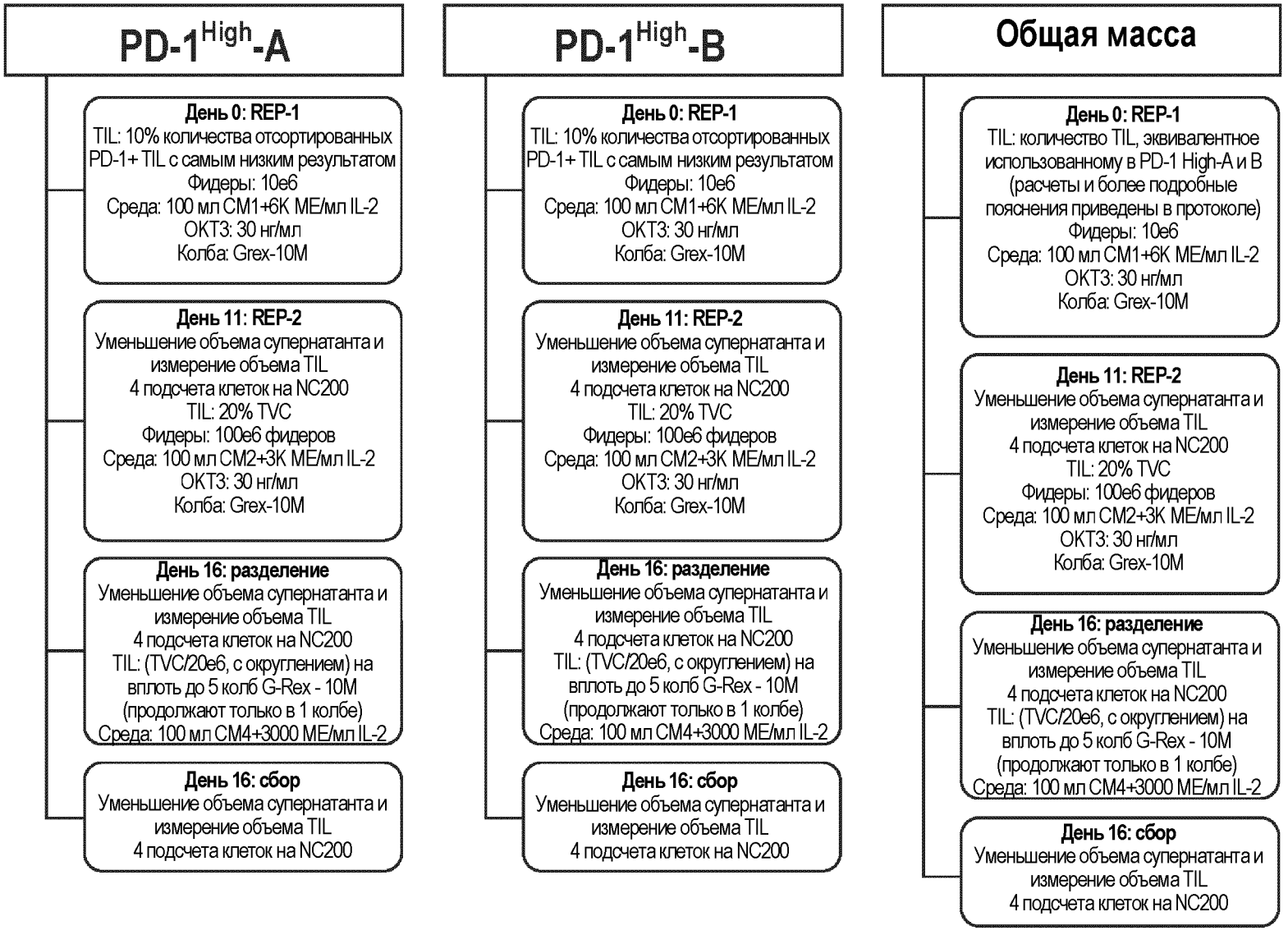
ФИГ. 152


100
80
60
40
20
0
%CD3
**
CD39
CD49a
CD103
PD1-отобранные TIL
Неотобранные TIL

ФИГ. 153

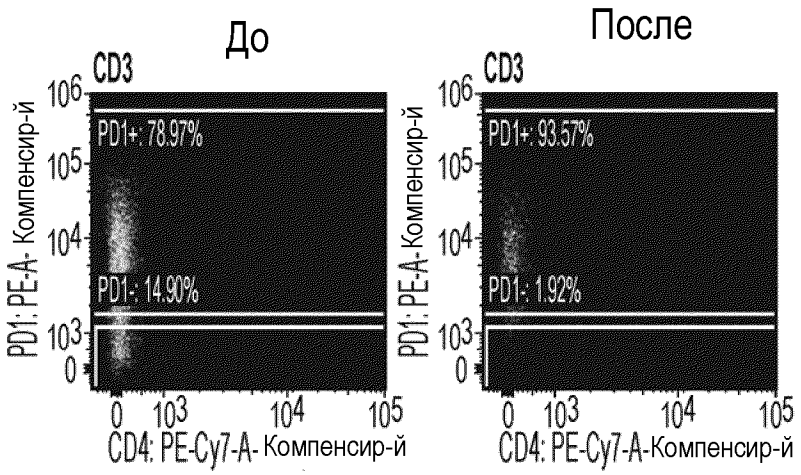
Условия	**Полномасштабный процесс**
REP-1 **TIL** **Фидеры** **CM1** **IL-2** **OKT3 (30 нг/мл)** **G-Rex**	**День 0:** REP-1 Количество отсортированных по PD-1 100e6 1 л 6000 МЕ/мл 30 нг/мл 100MCS
REP-2 **TIL** **Фидеры** **CM2** **IL-2** **OKT3 (30 нг/мл)** **G-Rex**	**День 11:** REP-2 5e6-200e6 TVC 5e9 5 л 3000 МЕ/мл 30 нг/мл 500MCS
Масштабирование	**День 16:** Уменьшение объема и разделение на вплоть до 5 G-Rex500MCS в CM4 + 3000 МЕ/мл IL-2
Сбор в REP-2	**День 22:** Сбор в REP-2

ФИГ. 154

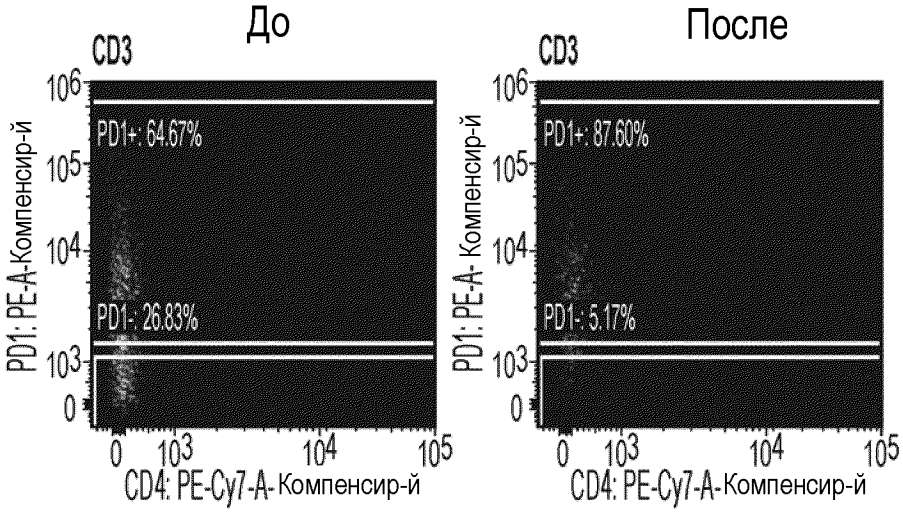

PD-1High-A
День 0: REP-1
TIL: 10% количества отсортированных PD-1+ TIL с самым низким результатом
Фидеры: 10e6
Среда: 100 мл CM1+6K МЕ/мл IL-2
OKT3: 30 нг/мл
Колба: Grex-10M
День 11: REP-2
Уменьшение объема супернатанта и измерение объема TIL
4 подсчета клеток на NC200
TIL: 20% TVC
Фидеры: 100e6 фидеров
Среда: 100 мл CM2+3K МЕ/мл IL-2
OKT3: 30 нг/мл
Колба: Grex-10M
День 16: разделение
Уменьшение объема супернатанта и измерение объема TIL
4 подсчета клеток на NC200
TIL: (TVC/20e6, с округлением) на вплоть до 5 колб G-Rex - 10M (продолжают только в 1 колбе)
Среда: 100 мл CM4+3000 МЕ/мл IL-2
День 16: сбор
Уменьшение объема супернатанта и измерение объема TIL
4 подсчета клеток на NC200
PD-1High-B
День 0: REP-1
TIL: 10% количества отсортированных PD-1+ TIL с самым низким результатом
Фидеры: 10e6
Среда: 100 мл CM1+6K МЕ/мл IL-2
OKT3: 30 нг/мл
Колба: Grex-10M
День 11: REP-2
Уменьшение объема супернатанта и измерение объема TIL
4 подсчета клеток на NC200
TIL: 20% TVC
Фидеры: 100e6 фидеров
Среда: 100 мл CM2+3K МЕ/мл IL-2
OKT3: 30 нг/мл
Колба: Grex-10M
День 16: разделение
Уменьшение объема супернатанта и измерение объема TIL
4 подсчета клеток на NC200
TIL: (TVC/20e6, с округлением) на вплоть до 5 колб G-Rex - 10M (продолжают только в 1 колбе)
Среда: 100 мл CM4+3000 МЕ/мл IL-2
День 16: сбор
Уменьшение объема супернатанта и измерение объема TIL
4 подсчета клеток на NC200
Общая масса
День 0: REP-1
TIL: количество TIL, эквивалентное использованному в PD-1 High-A и B (расчеты и более подробные пояснения приведены в протоколе)
Фидеры: 10e6
Среда: 100 мл CM1+6K МЕ/мл IL-2
OKT3: 30 нг/мл
Колба: Grex-10M
День 11: REP-2
Уменьшение объема супернатанта и измерение объема TIL
4 подсчета клеток на NC200
TIL: 20% TVC
Фидеры: 100e6 фидеров
Среда: 100 мл CM2+3K МЕ/мл IL-2
OKT3: 30 нг/мл
Колба: Grex-10M
День 16: разделение
Уменьшение объема супернатанта и измерение объема TIL
4 подсчета клеток на NC200
TIL: (TVC/20e6, с округлением) на вплоть до 5 колб G-Rex - 10M (продолжают только в 1 колбе)
Среда: 100 мл CM4+3000 МЕ/мл IL-2
День 16: сбор
Уменьшение объема супернатанта и измерение объема TIL
4 подсчета клеток на NC200

ФИГ. 155

Мелкомасштабный L4093

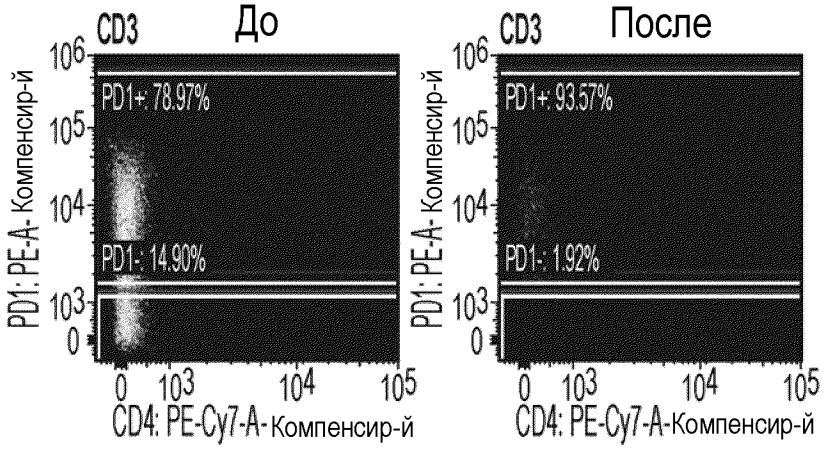


M1135

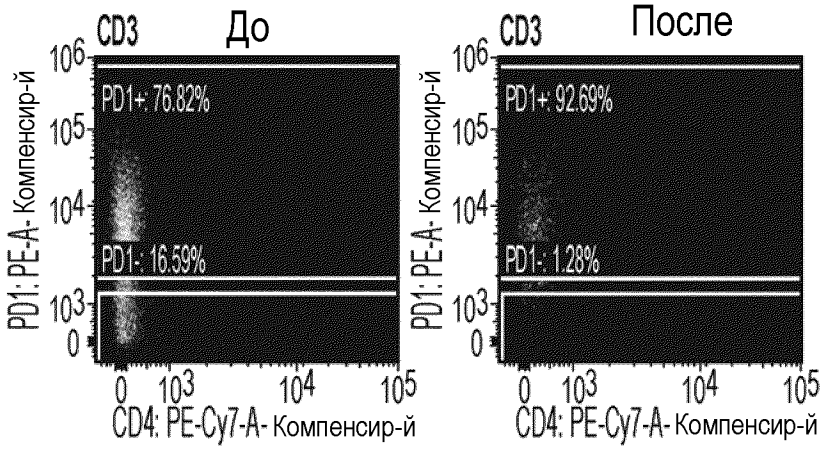


ФИГ. 156А

Крупномасштабный H3032



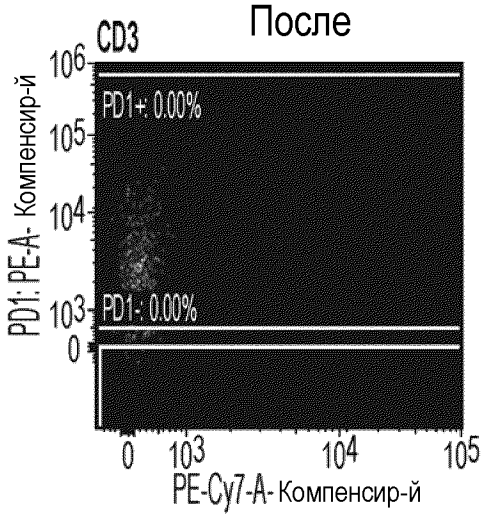
Крупномасштабный H3034



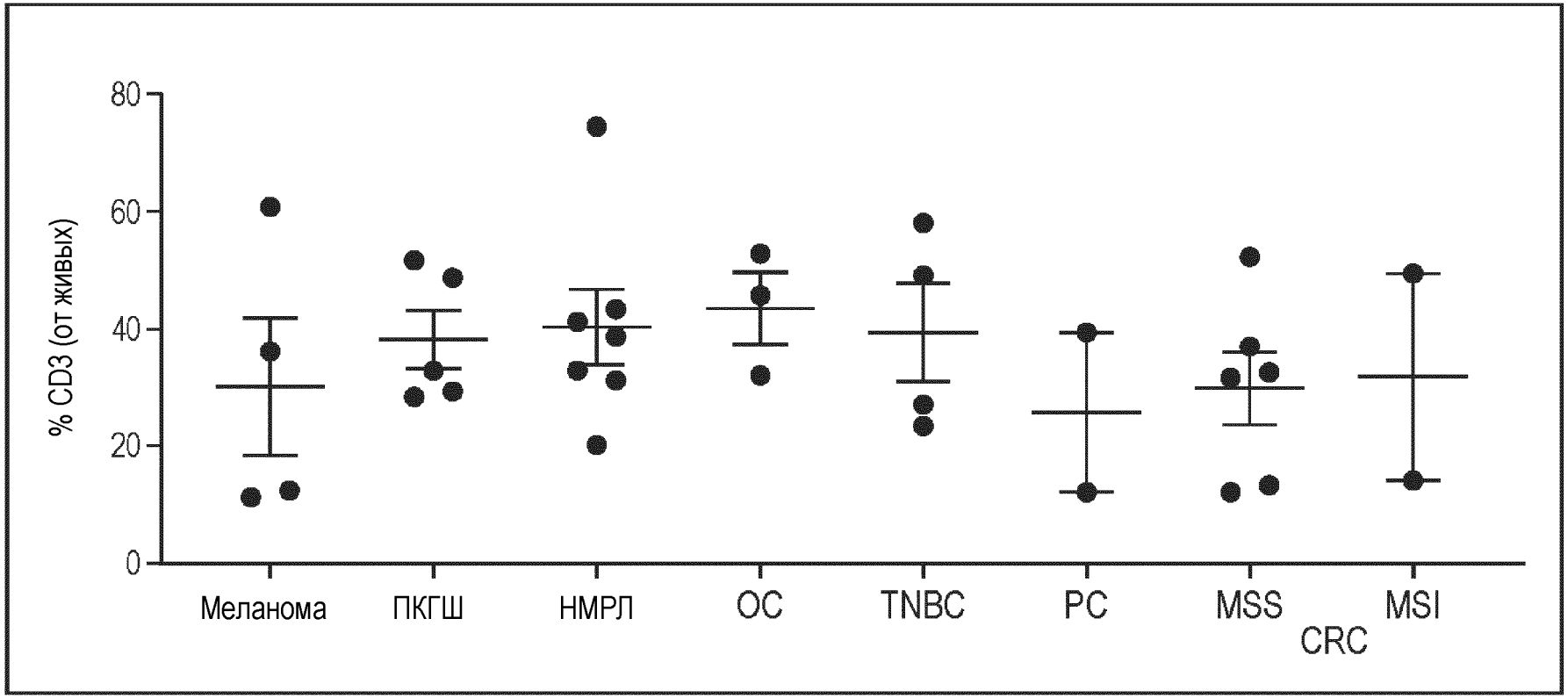
Крупномасштабный M1137

До

Данные не собраны



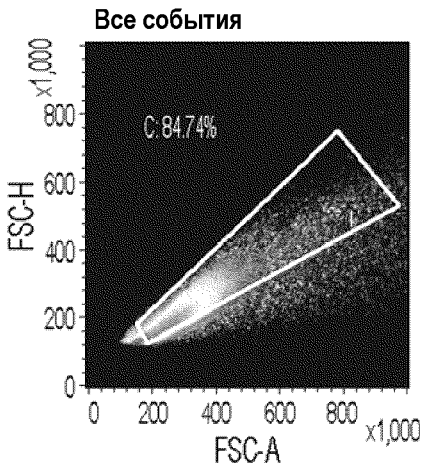
ФИГ. 156B

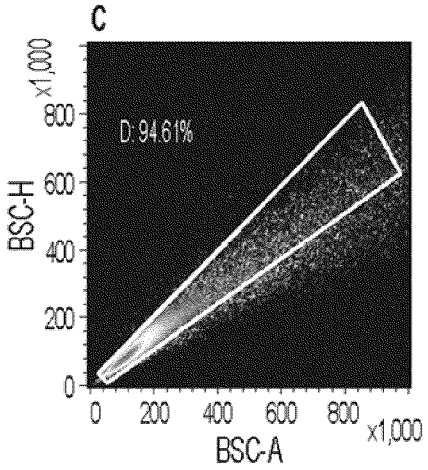


Легенда: экспрессия PD-1 в нескольких гистологиях. Проценты PD-1+ TIL в популяции CD3+ TIL нанесены на график для отдельных образцов в каждой гистологии. Горизонтальные линии представляют собой средние проценты каждой субпопуляции, а вертикальные линии представляют собой стандартные ошибки.

ФИГ. 157

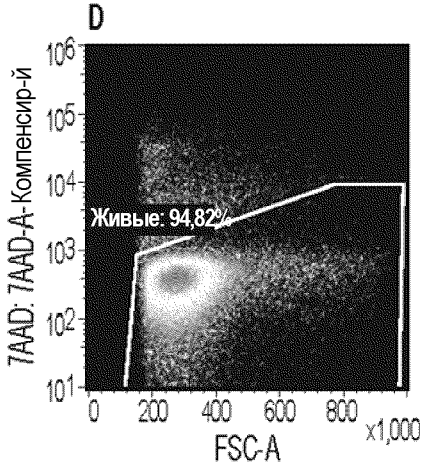
Рабочий лист

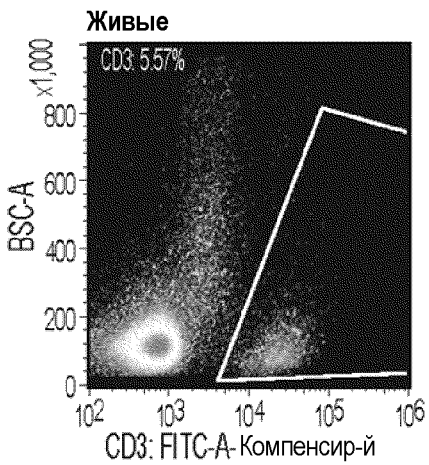


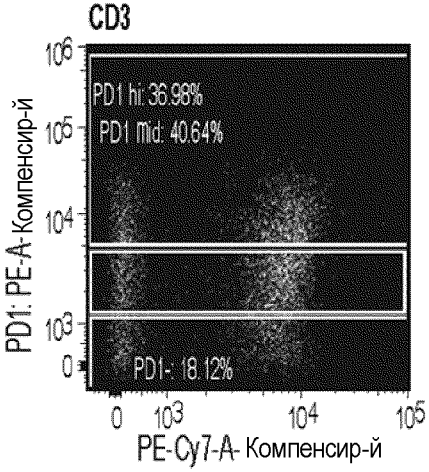


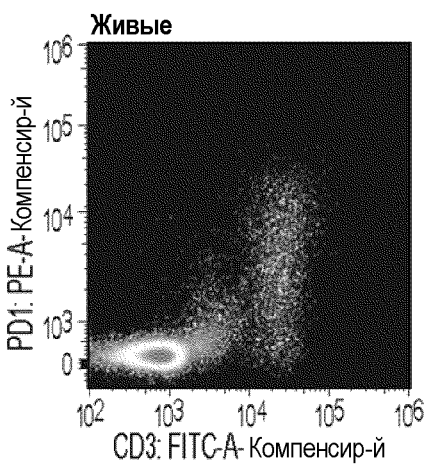
Гейты и статистика Отображение 100000 / 707455 событий

Название	События	%Исходн.	% Всего	
Все события	100,000	0.00%	100.00%	
C	84,736	84.74%	84.74%	
D	80,165	94.61%	80.17%	
Живые	76,009	94.82%	76.01%	
CD3	4,232	5.57%	4.23%	
PD1 hi	1,565	36.98%	1.57%	
PD1-	767	18.12%	0.77%	
PD1 mid	1,720	40.64%	1.72%	
J	63,530	63.53%	63.53%	



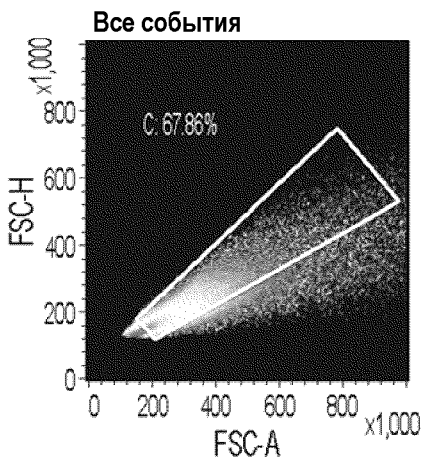


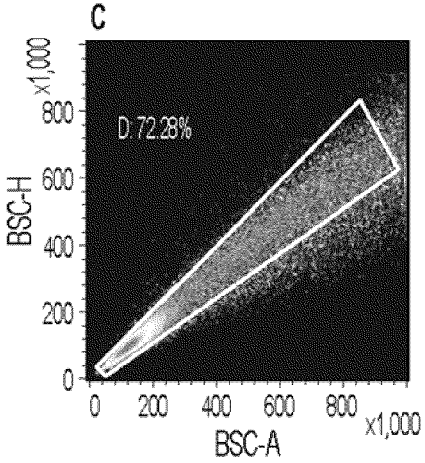




ФИГ. 158A

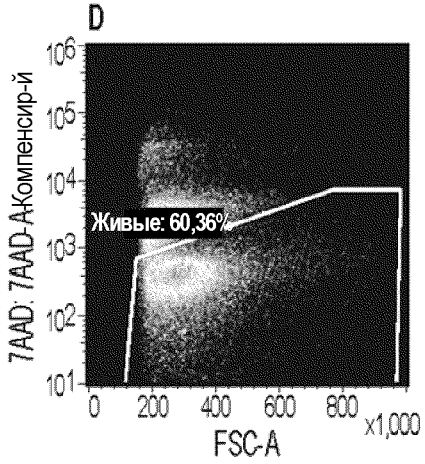
Рабочий лист

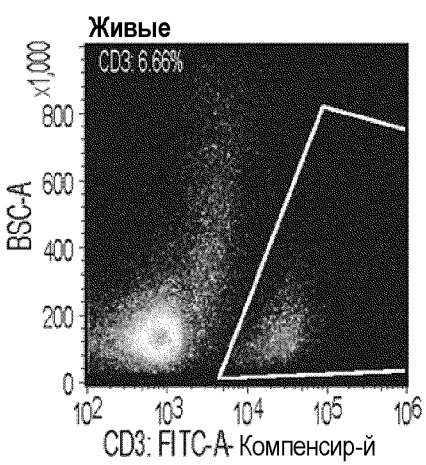


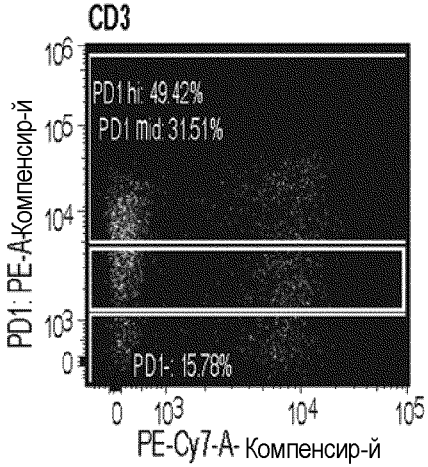


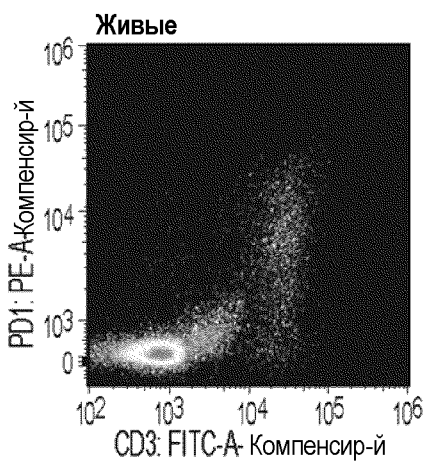
Гейты и статистика Отображение 100000 / 1578350 событий

Название	События	%Исходн.	% Всего
Все события	100,000	0.00%	100.00%
C	67,857	67.86%	67.86%
D	49,049	72.28%	49.05%
Живые	29,607	60.36%	29.61%
CD3	1,971	6.66%	1.97%
PD1 hi	974	49.42%	0.97%
PD1-	311	15.78%	0.31%
PD1 mid	621	31.51%	0.62%
J	25,031	25.03%	25.03%



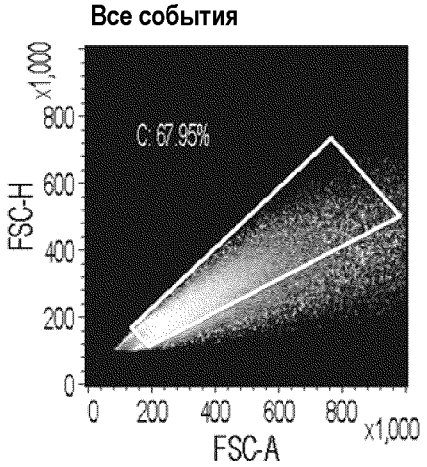


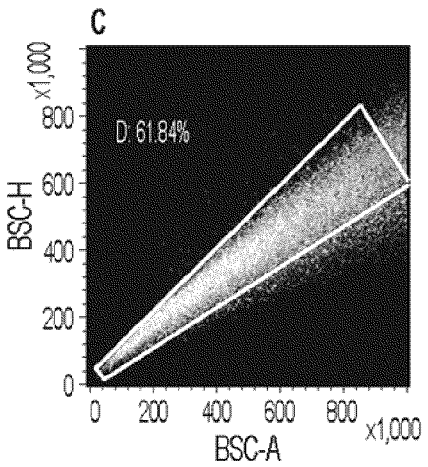




ФИГ. 158B

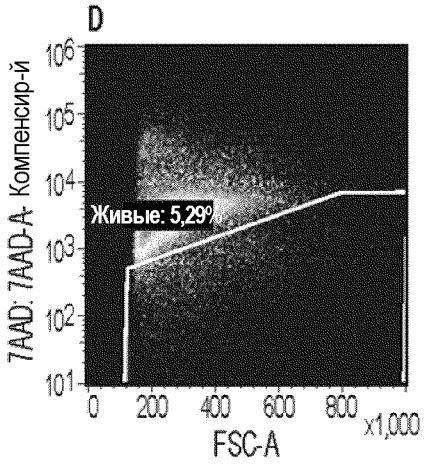
Рабочий лист

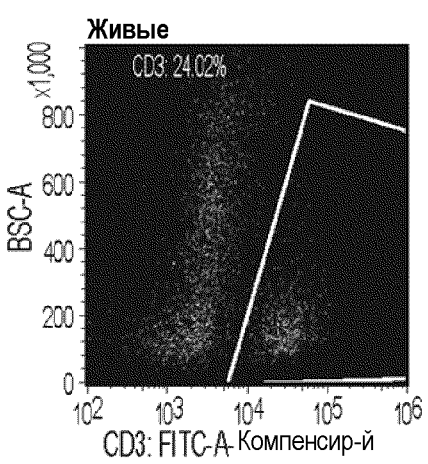


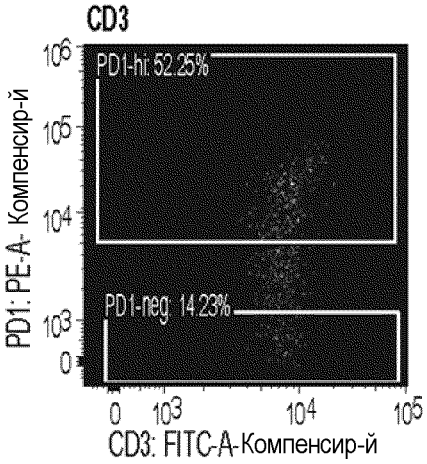


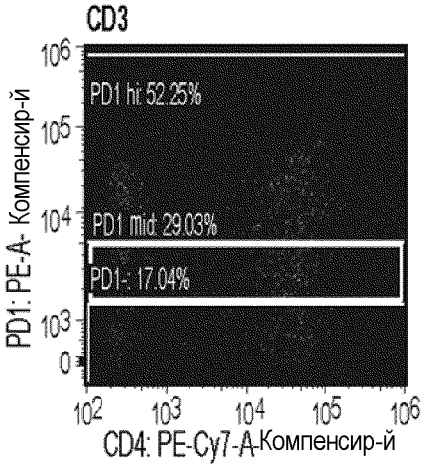
Гейты и статистика Отображение 100000 / 1358951 события

Название	События	%Исходн.	% Всего
Все события	100,000	0.00%	100.00%
C	67,954	67.95%	67.95%
D	42,020	61.84%	42.2%
Живые	2,223	5.29%	2.22%
CD3	534	24.02%	0.53%
PD1 hi	279	52.25%	0.28%
PD1-	91	17.04%	0.09%
PD1-hi	279	52.25%	0.28%
PD1-neg	76	14.23%	0.08%
PD1 mid	155	29.03%	0.16%
J	1,918	1.92%	1.92%



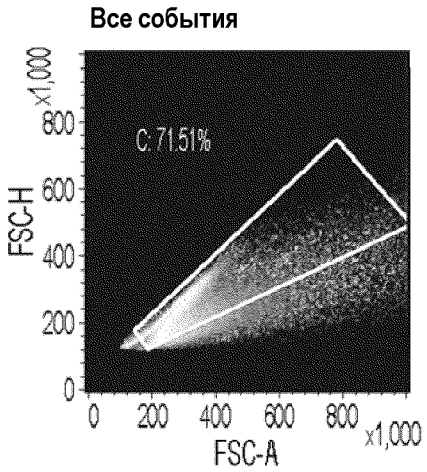


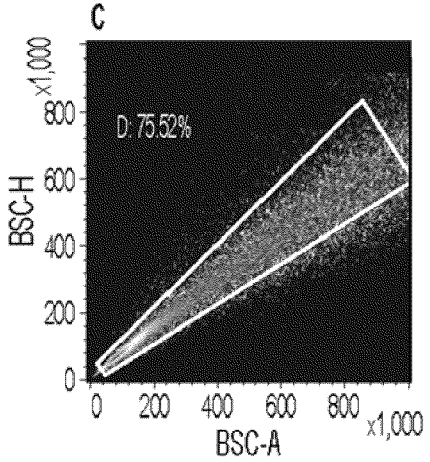




ФИГ. 158C

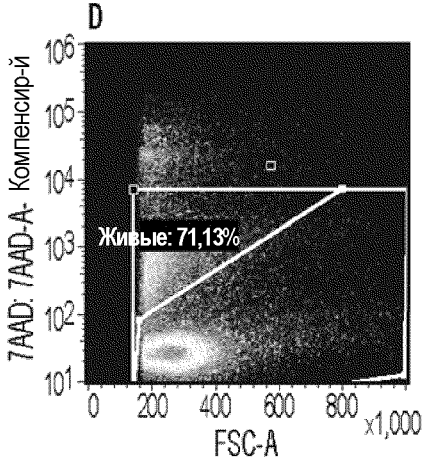
Рабочий лист

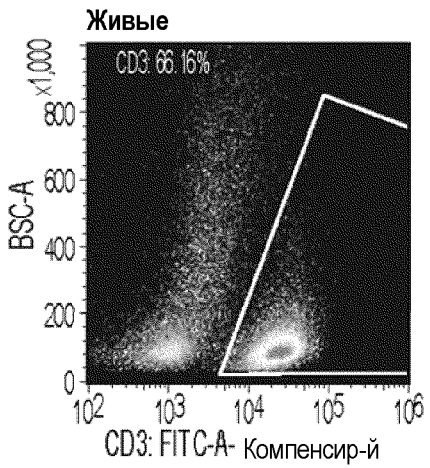


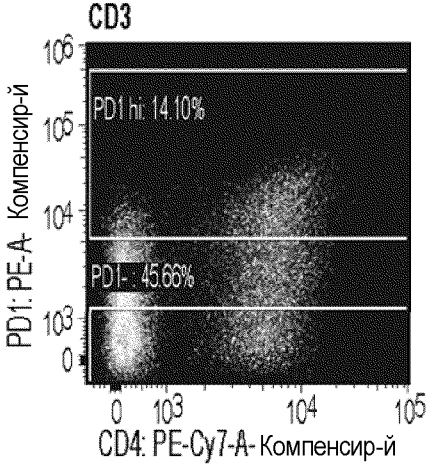


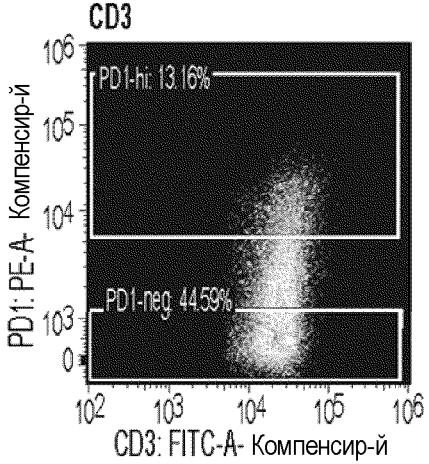
Гейты и статистика Отображение 100000 / 115596 событий

Название	События	%Исходн.	% Всего
Все события	100,000	0.00%	100.00%
C	71,513	71.51%	71.51%
D	54,010	75.52%	54.01%
Живые	38,419	71.13%	38.42%
CD3	25,417	66.16%	25.42%
PD1 hi	3,585	14.10%	3.59%
PD1-	11,606	45.66%	11.61%
PD1-hi	3,346	13.16%	3.35%
PD1-neg	11,334	44.59%	11.33%
J	25,739	25.74%	25.74%





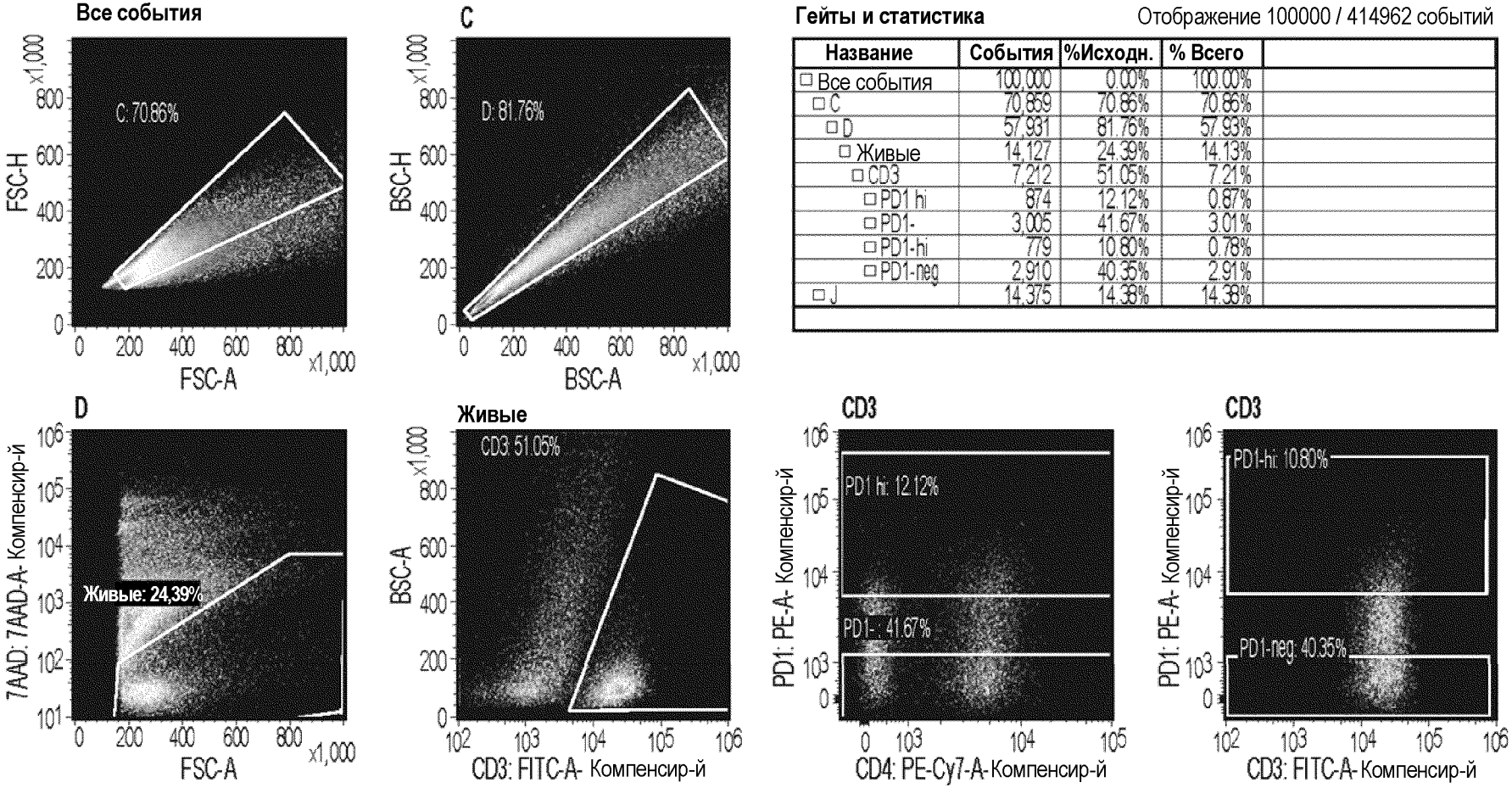




ФИГ. 158D

user1/190820 pd1 research/Super Sort/CC10037 sort ([2 Way] Data Source - 1)

Рабочий лист



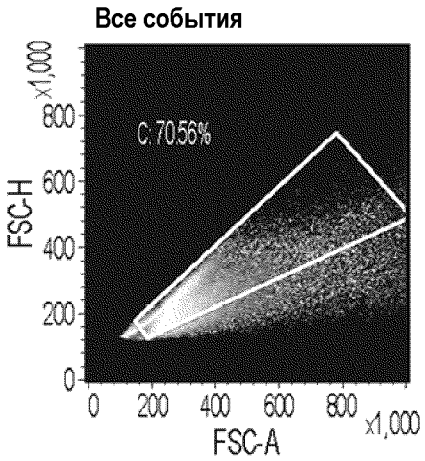
Гейты и статистика Отображение 100000 / 414962 событий

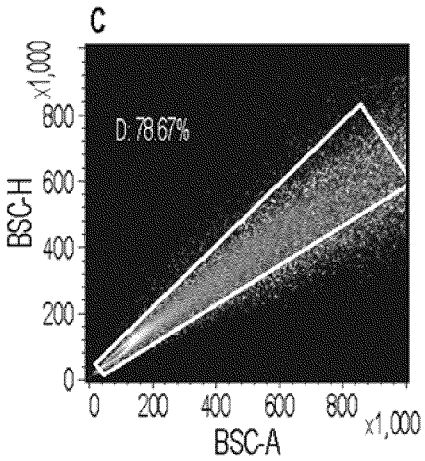
Название	События	%Исходн.	% Всего
Все события	100,000	0.00%	100.00%
C	70,859	70.86%	70.86%
D	57,931	81.76%	57.93%
Живые	14,127	24.39%	14.13%
CD3	7,212	51.05%	7.21%
PD1 hi	874	12.12%	0.87%
PD1-	3,005	41.67%	3.01%
PD1-hi	779	10.80%	0.78%
PD1-neg	2,910	40.35%	2.91%
J	14,375	14.38%	14.38%

ФИГ. 158E

user1/190820 pd1 research/Super Sort/CC10039 sort ([2 Way] Data Source - 1)

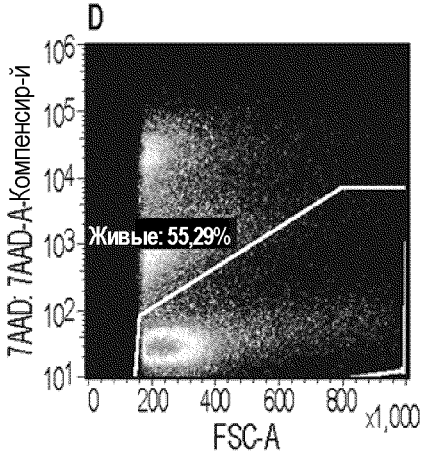
Рабочий лист

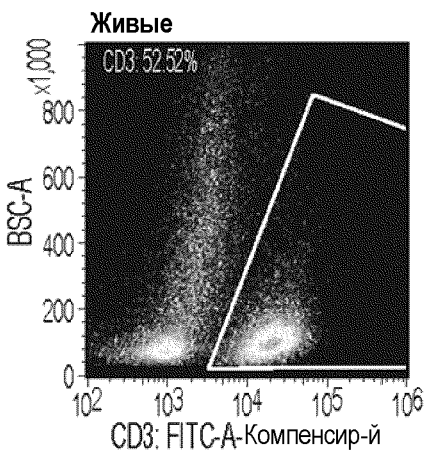


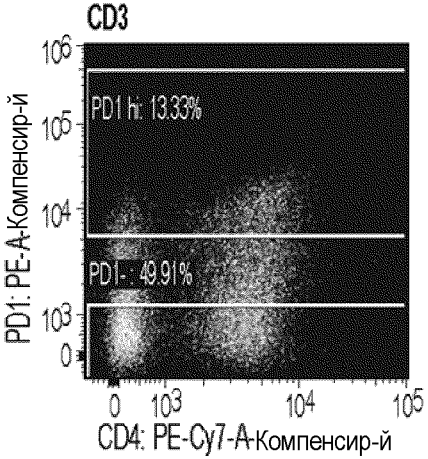


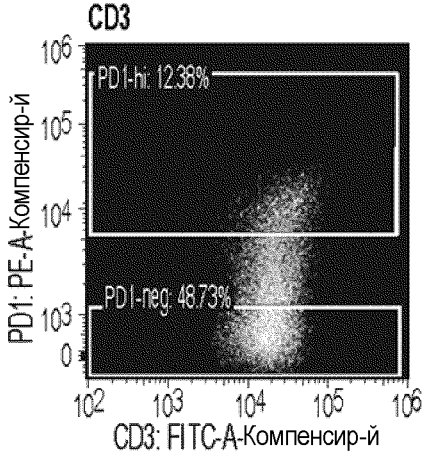
Гейты и статистика Отображение 100000 / 186327 событий

Название	События	%Исходн.	% Всего
□ Все события	100,000	0.00%	100.00%
□ C	70,563	70.56%	70.56%
□ D	55,510	78.67%	55.51%
□ Живые	30,691	55.29%	30.69%
□ CD3	16,118	52.52%	16.12%
□ PD1 hi	2,149	13.33%	2.15%
□ PD1-	8,044	49.91%	8.04%
□ PD1-hi	1,995	12.38%	2.00%
□ PD1-neg	7,854	48.73%	7.85%
□ J	19,647	19.65%	19.65%



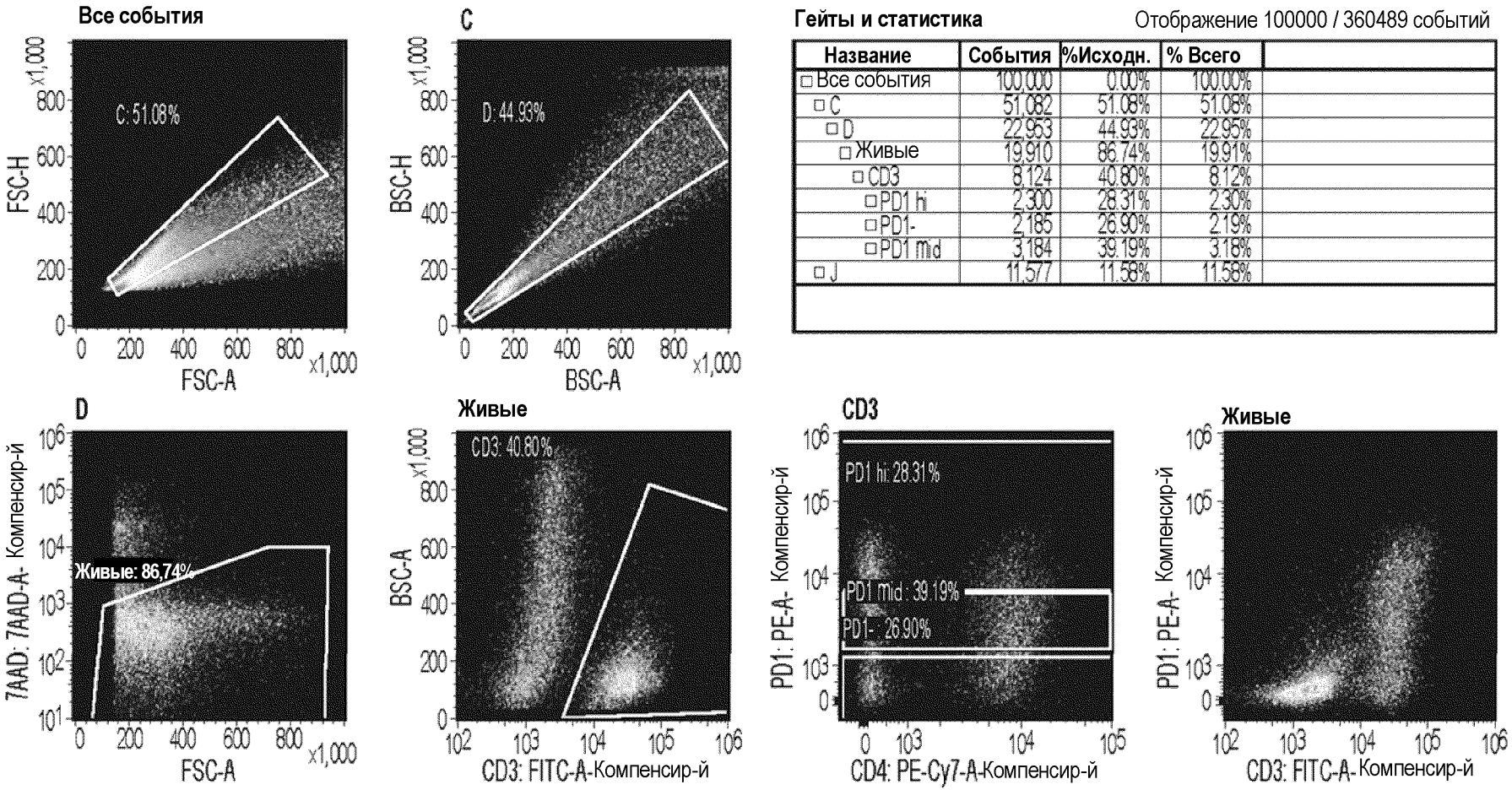






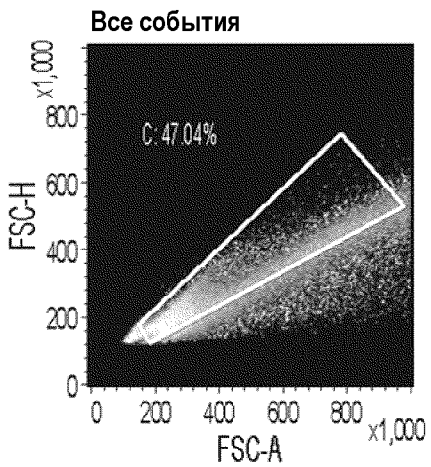
ФИГ. 158F

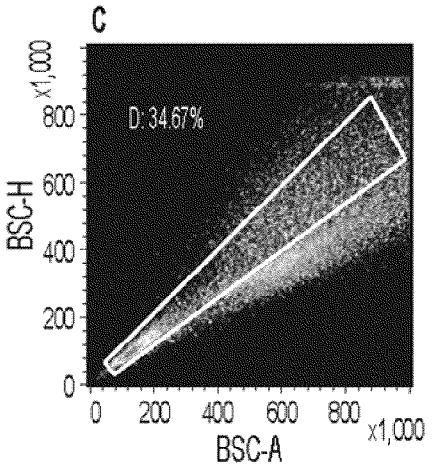
Рабочий лист



ФИГ. 158G

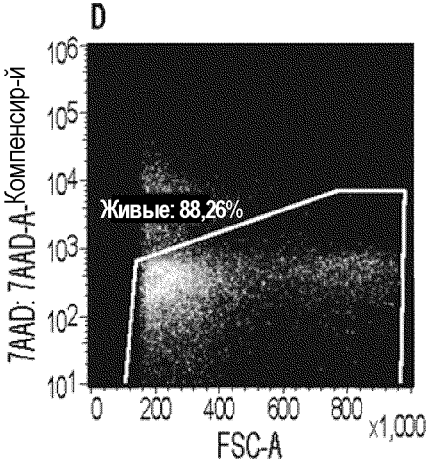
Рабочий лист

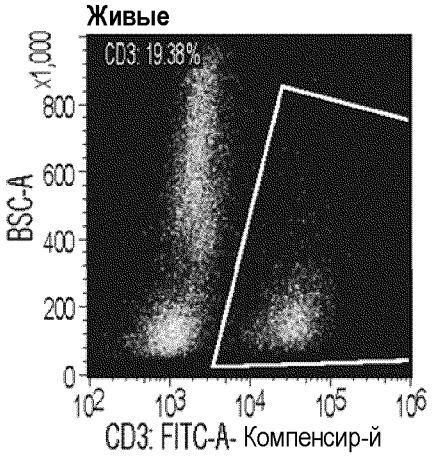


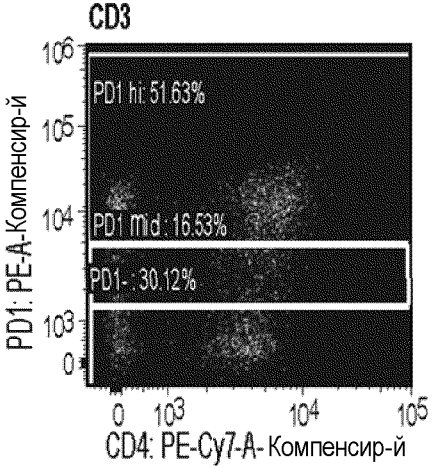


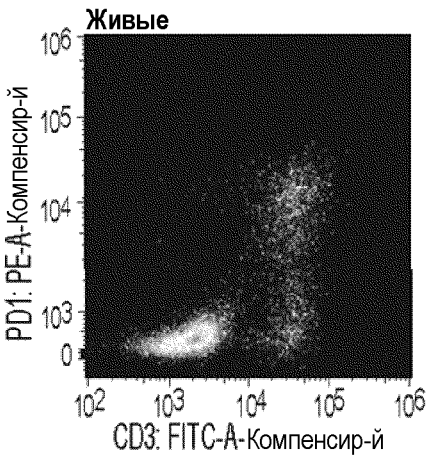
Гейты и статистика Отображение 100000 / 1080259 событий

Название	События	%Исходн.	% Всего	
□ Все события	100,000	0.00%	100.00%	
□ C	47,038	47.04%	47.04%	
□ D	16,307	34.67%	16.31%	
□ Живые	14,392	88.26%	14.39%	
□ CD3	2,789	19.38%	2.79%	
□ PD1 hi	1,440	51.63%	1.44%	
□ PD1-	840	30.12%	0.84%	
□ PD1 Mid	461	16.53%	0.46%	
□ J	9,445	9.45%	9.45%	



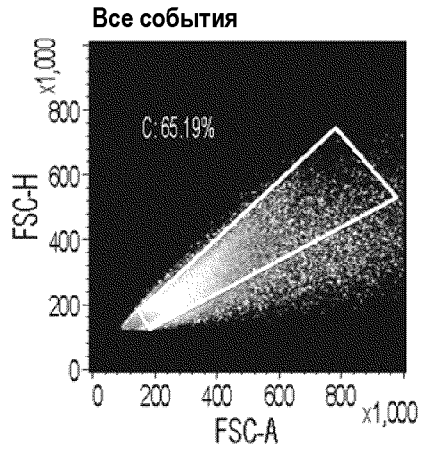


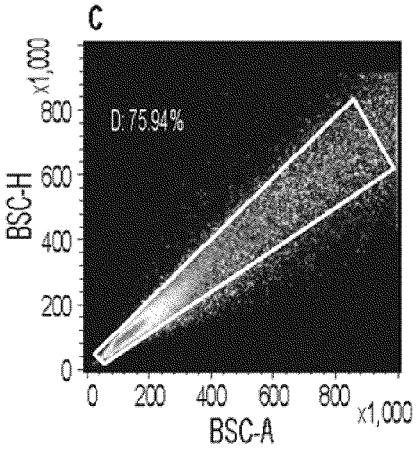




ФИГ. 158H

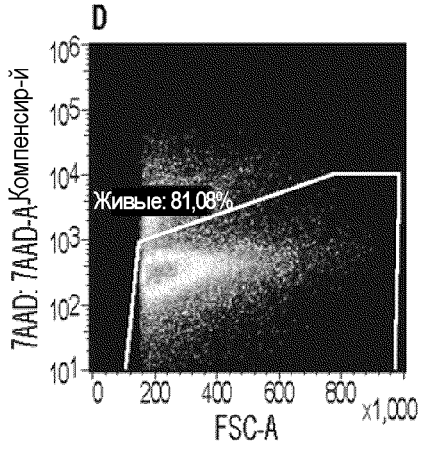
Рабочий лист

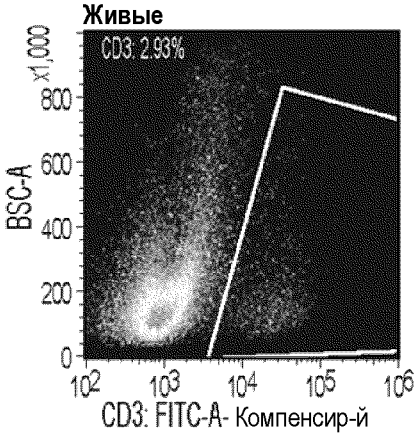


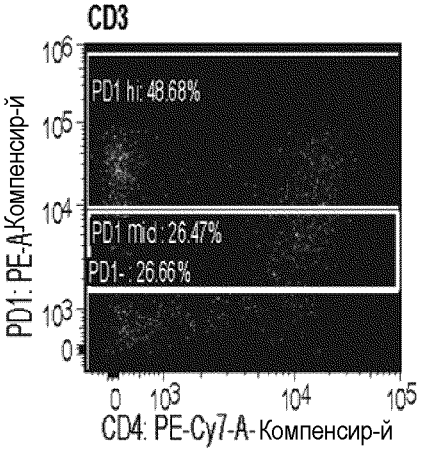


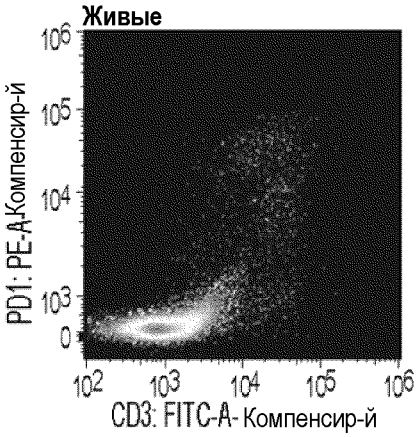
Гейты и статистика Отображение 100000 / 2668742 события

Название	События	%Исходн.	% Всего	
Все события	100,000	0.00%	100.00%	
C	65,193	65.19%	65.19%	
D	49,508	75.94%	49.51%	
Живые	40,140	81.08%	40.14%	
CD3	1,175	2.93%	1.18%	
PD1 hi	572	48.68%	0.57%	
PD1-	278	23.66%	0.28%	
PD1 mid	311	26.47%	0.31%	
J	28,662	28.66%	28.66%	



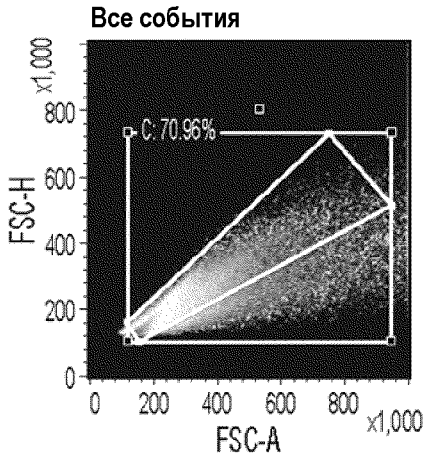


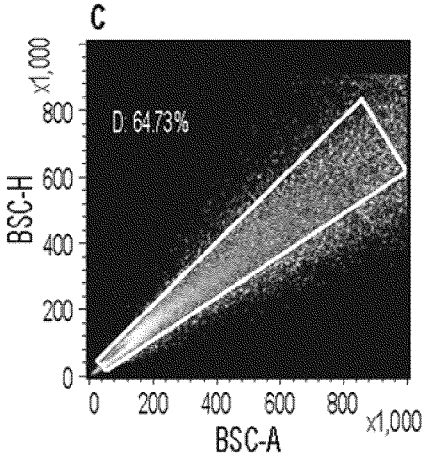




ФИГ. 158I

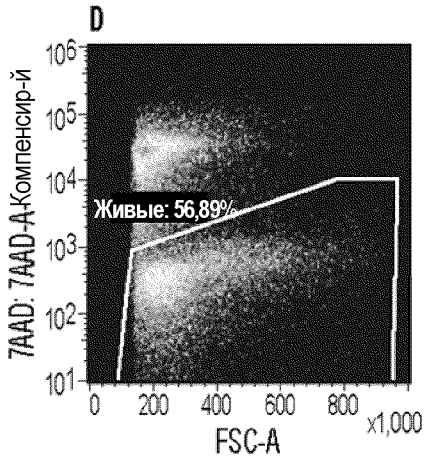
Рабочий лист

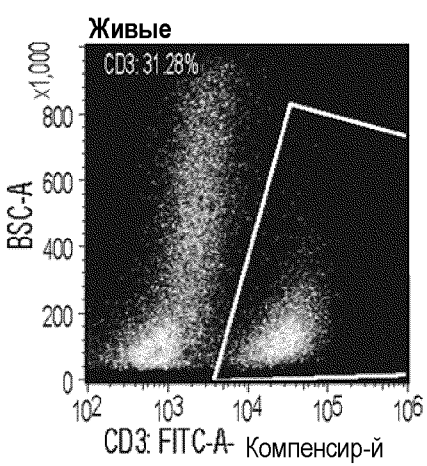


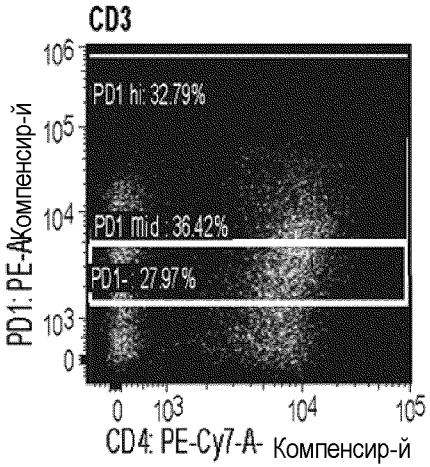


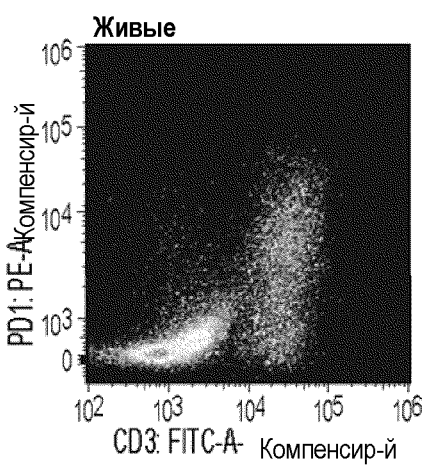
Гейты и статистика Отображение 100000 / 135889 событий

Название	События	%Исходн.	% Всего
Все события	100,000	0.00%	100.00%
C	70,958	70.96%	70.96%
D	45,928	64.73%	45.93%
Живые	26,130	56.89%	26.13%
CD3	8,173	31.28%	8.17%
PD1 hi	2,680	32.79%	2.68%
PD1-	2,286	27.97%	2.29%
PD1 Mid	2,977	36.42%	2.98%
J	13,976	13.98%	13.98%





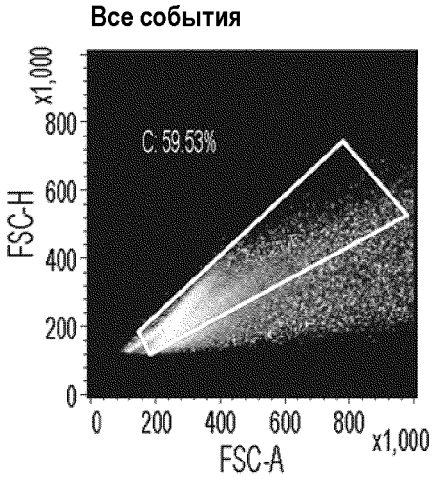


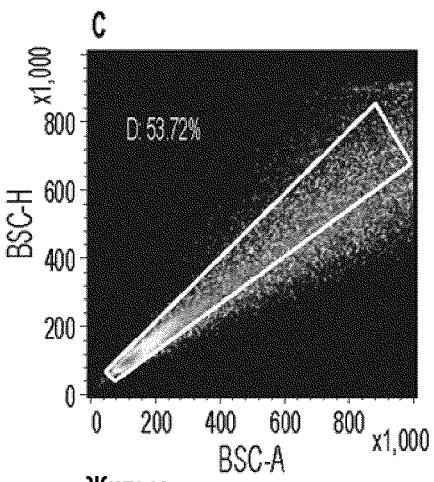


ФИГ. 158J

user1/190318 pd1/Super Sort/H3039 sort ([2 Way] Data Source - 1)

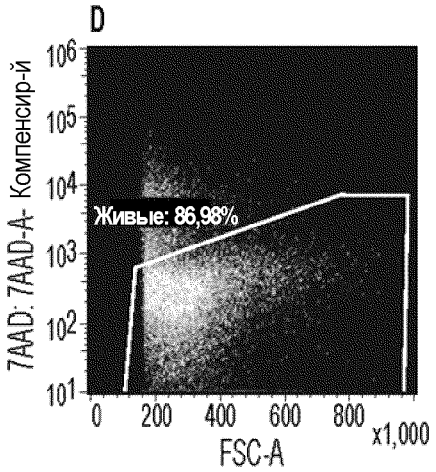
Рабочий лист

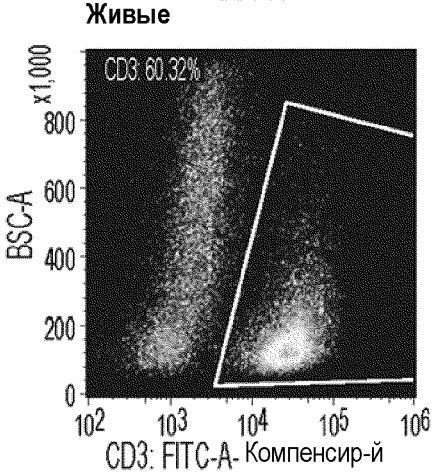


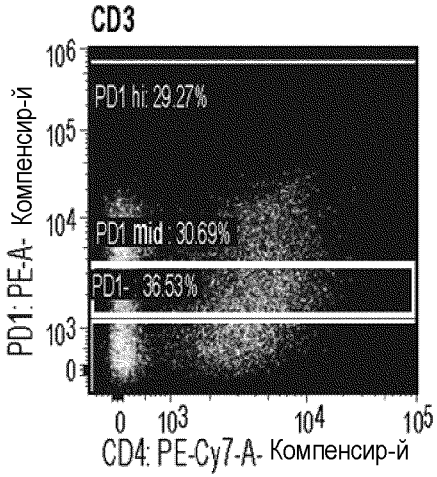


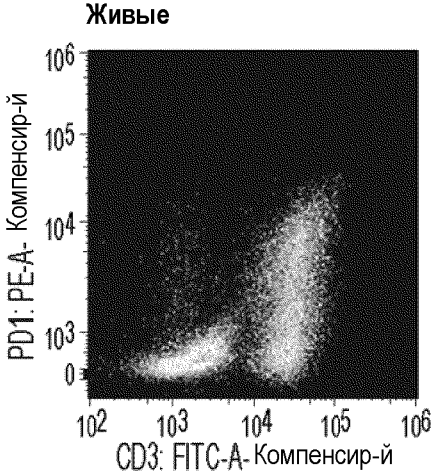
Гейты и статистика Отображение 100000 / 177600 событий

Название	События	%Исходн.	% Всего	
Все события	100,000	0.00%	100.00%	
C	59,528	59.53%	59.53%	
D	31,981	53.72%	31.98%	
Живые	27,816	86.98%	27.82%	
CD3	16,778	60.32%	16.78%	
PD1 hi	4,911	29.27%	4.91%	
PD1-	6,129	36.53%	6.13%	
PD1 mid	5,149	30.69%	5.15%	
J	17,783	17.78%	17.78%	



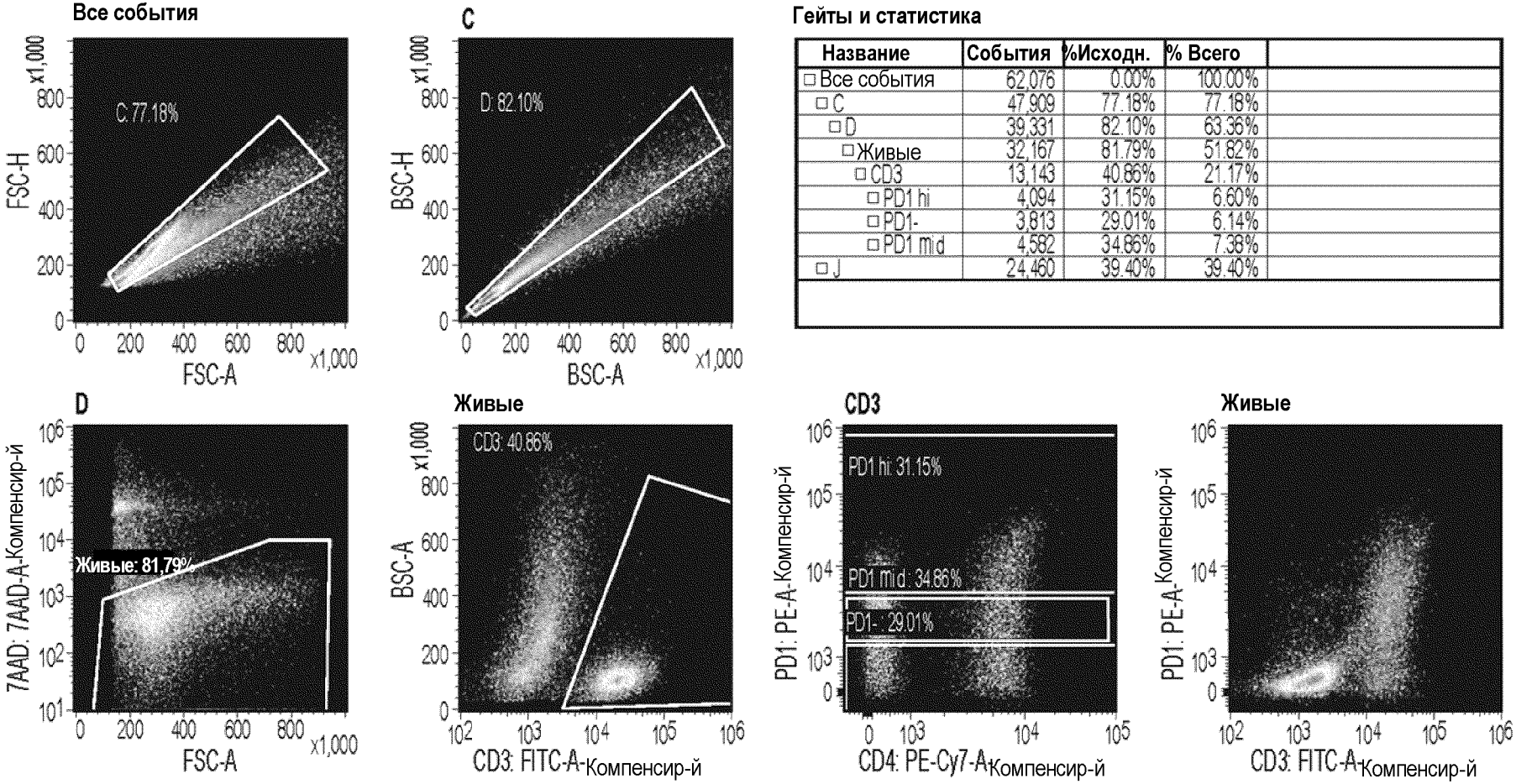






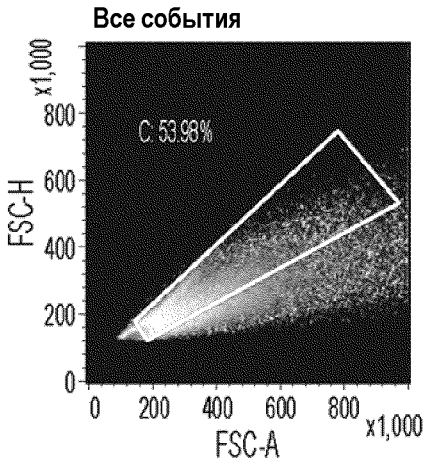
ФИГ. 158K

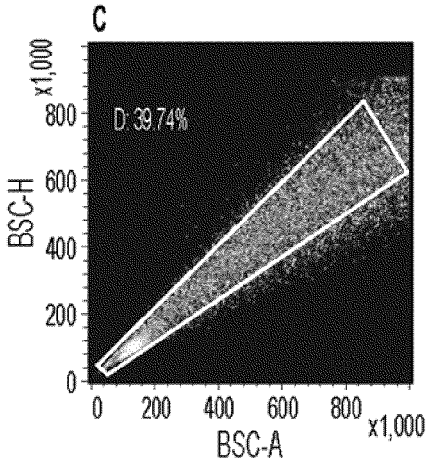
Рабочий лист



ФИГ. 158L

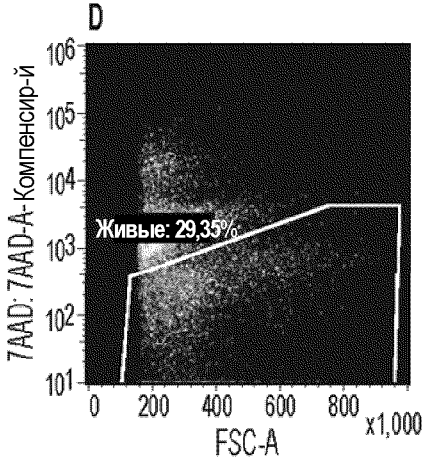
Рабочий лист

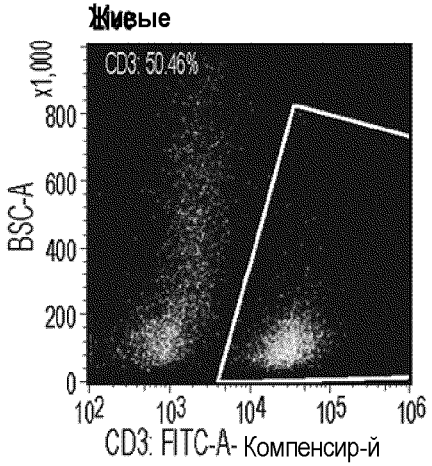


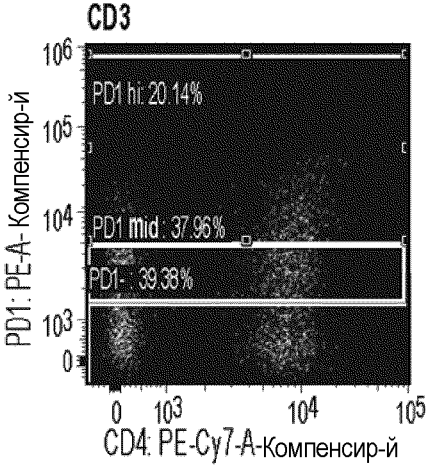


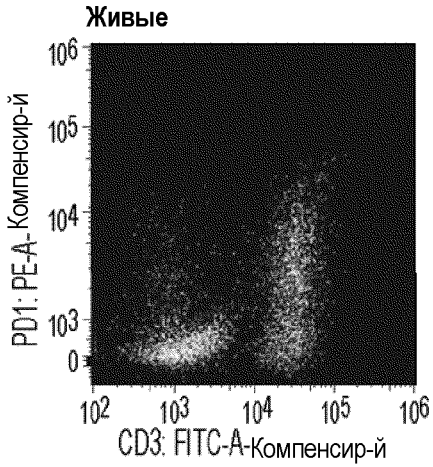
Гейты и статистика Отображение 100000 / 946878 событий

Название	События	%Исходн.	% Всего
□ Все события	100,000	0.00%	100.00%
□ C	53,980	53.98%	53.98%
□ D	21,453	39.74%	21.45%
□ Живые	6,296	29.35%	6.30%
□ CD3	3,177	50.46%	3.18%
□ PD1 hi	640	20.14%	0.64%
□ PD1-	1,251	39.38%	1.25%
□ PD1 mid	1,206	37.96%	1.21%
□ J	4,633	4.63%	4.63%



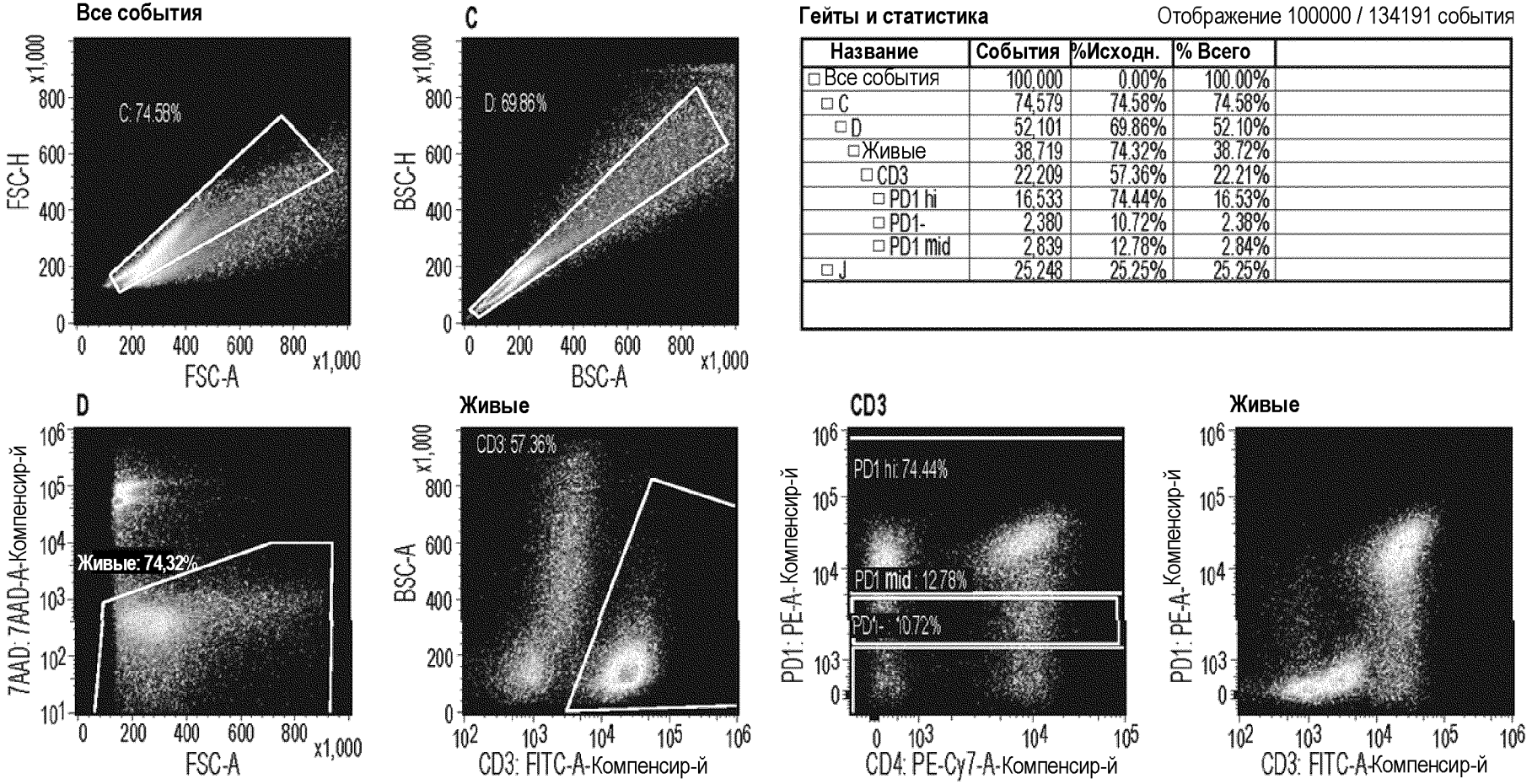






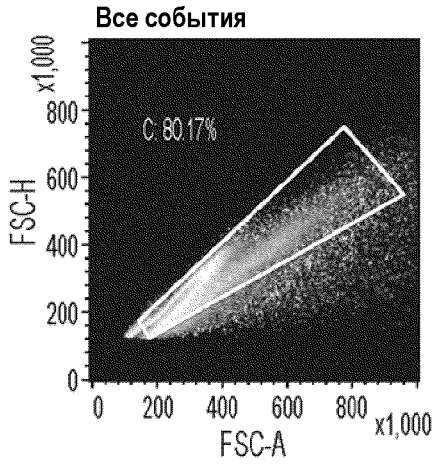
ФИГ. 158M

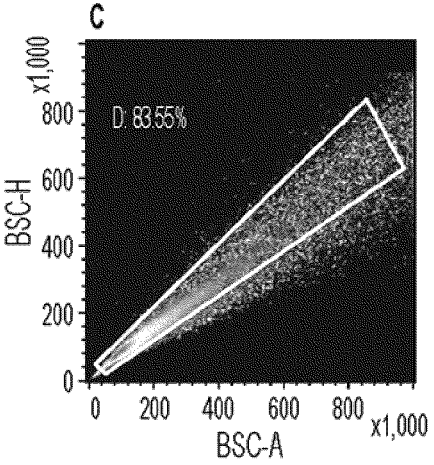
Рабочий лист



ФИГ. 158N

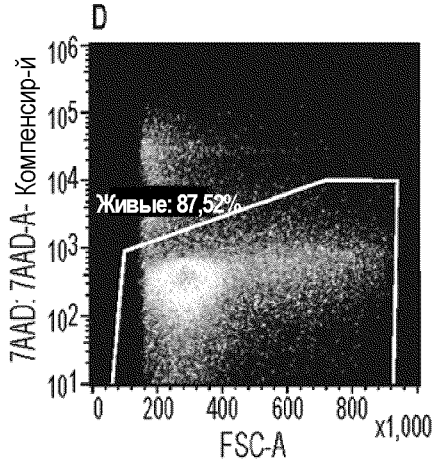
Рабочий лист

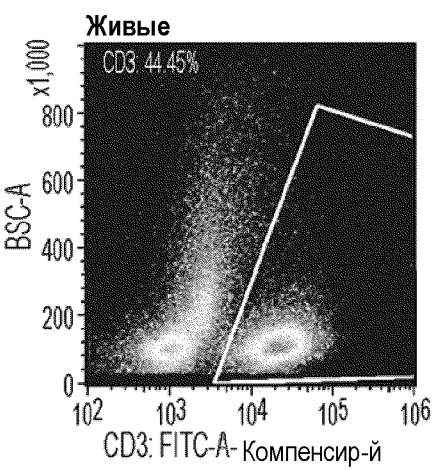


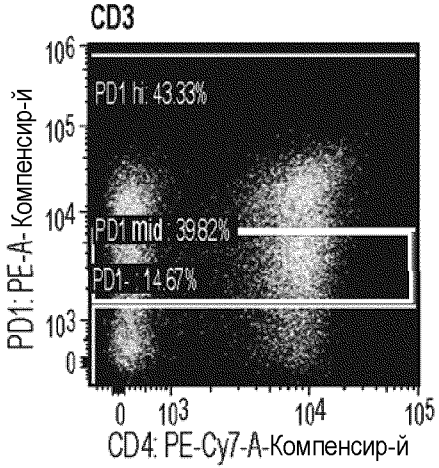


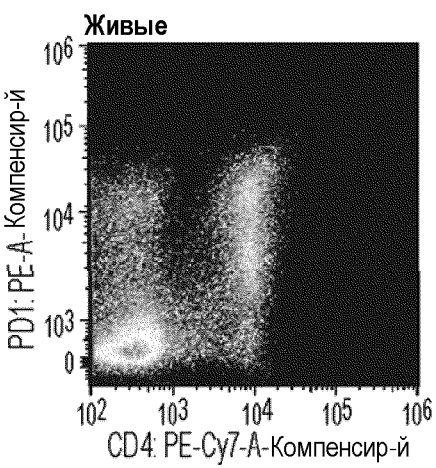
Гейты и статистика Отображение 100000 / 112189 событий

Название	События	%Исходн.	% Всего	
Все события	100,000	0.00%	100.00%	
C	80,171	80.17%	80.17%	
D	66,984	83.55%	66.98%	
Живые	58,623	87.52%	58.62%	
CD3	26,058	44.45%	26.06%	
PD1 hi	11,292	43.33%	11.29%	
PD1-	3,822	14.67%	3.82%	
PD1 mid	10,375	39.82%	10.38%	
J	46,314	46.31%	46.31%	



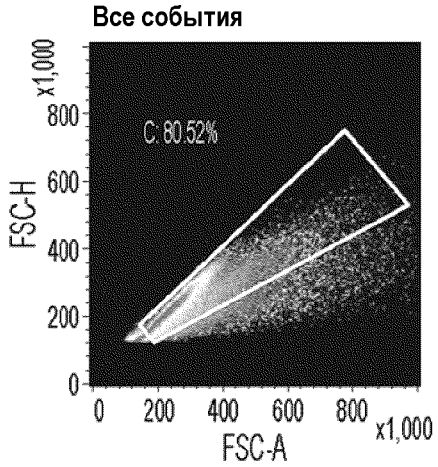


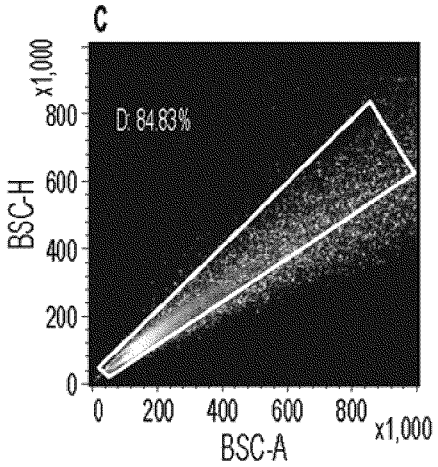




ФИГ. 158O

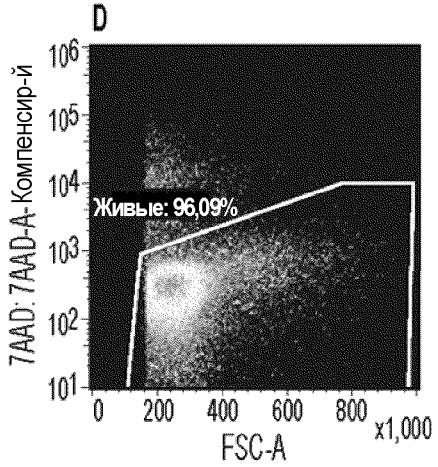
Рабочий лист

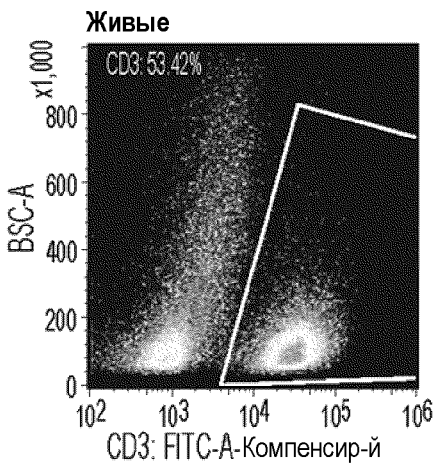


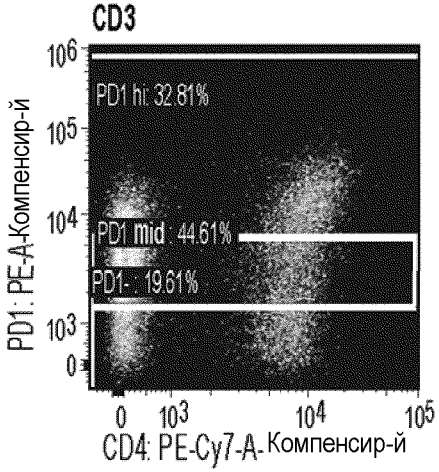


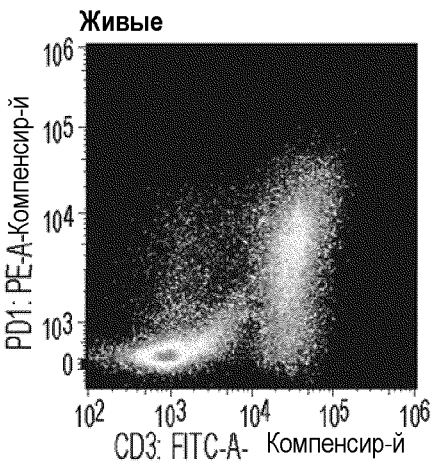
Гейты и статистика

Название	События	%Исходн.	% Всего
Все события	85,559	0.00%	100.00%
C	68,890	80.52%	80.52%
D	58,442	84.83%	68.31%
Живые	56,154	96.09%	65.63%
CD3	30,000	53.42%	35.06%
PD1 hi	9,842	32.81%	11.50%
PD1-	5,882	19.61%	6.87%
PD1 mid	13,382	44.61%	15.64%
J	34,608	40.45%	40.45%





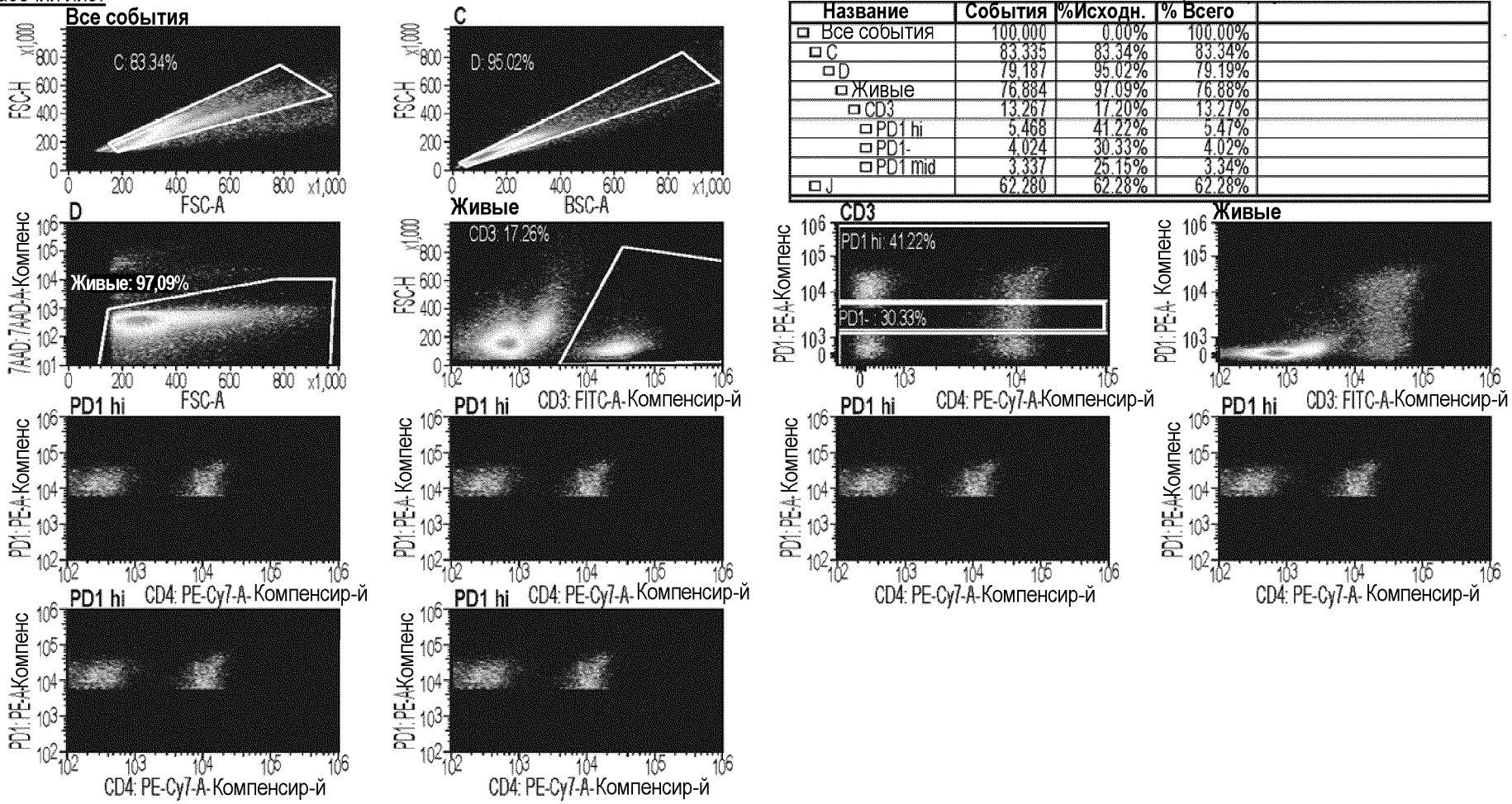




ФИГ. 158P

user1/190305 PD1 sort/Super Sort/L4104 sort ([2 Way] Data Source - 1)

Рабочий лист

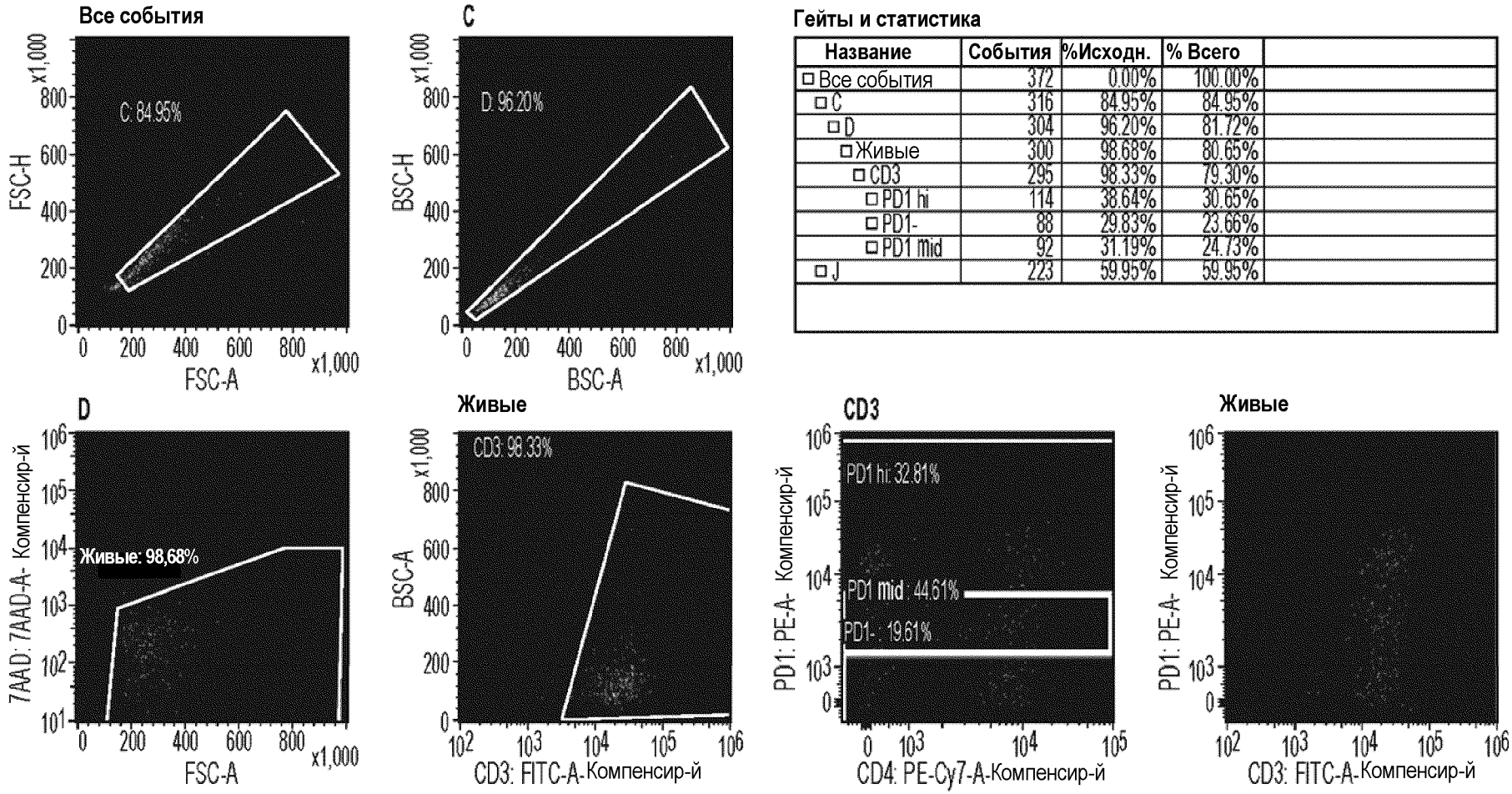


Гейты и статистика Отображение 100000 / 224346 событий

Название	События	%Исходн.	% Всего
Все события	100,000	0.00%	100.00%
C	83,335	83.34%	83.34%
D	79,187	95.02%	79.19%
Живые	76,884	97.09%	76.88%
CD3	13,267	17.20%	13.27%
PD1 hi	5,468	41.22%	5.47%
PD1-	4,024	30.33%	4.02%
PD1 mid	3,337	25.15%	3.34%
J	62,280	62.28%	62.28%

ФИГ. 158Q

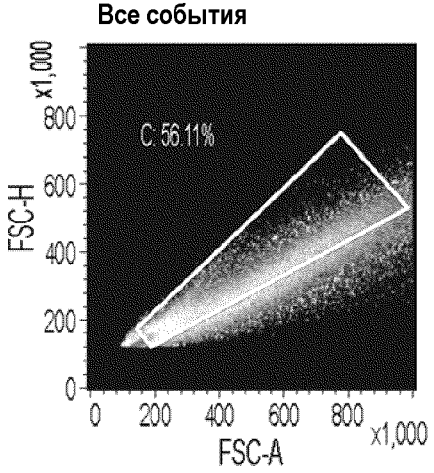
Рабочий лист

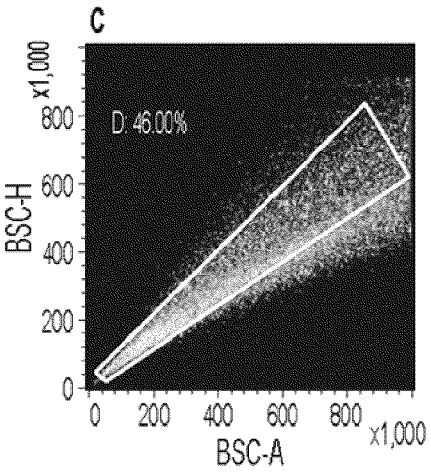


Название	События	%Исходн.	% Всего
Все события	372	0.00%	100.00%
C	316	84.95%	84.95%
D	304	96.20%	81.72%
Живые	300	98.68%	80.65%
CD3	295	98.33%	79.30%
PD1 hi	114	38.64%	30.65%
PD1-	88	29.83%	23.66%
PD1 mid	92	31.19%	24.73%
J	223	59.95%	59.95%

ФИГ. 158R

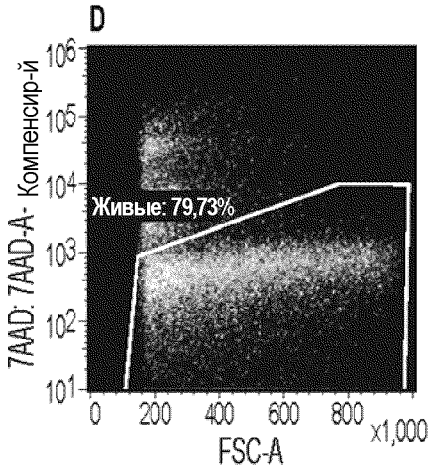
Рабочий лист

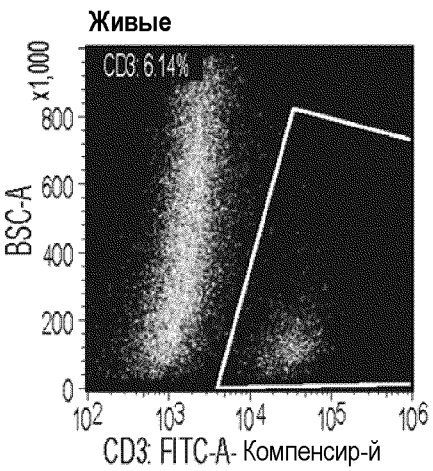


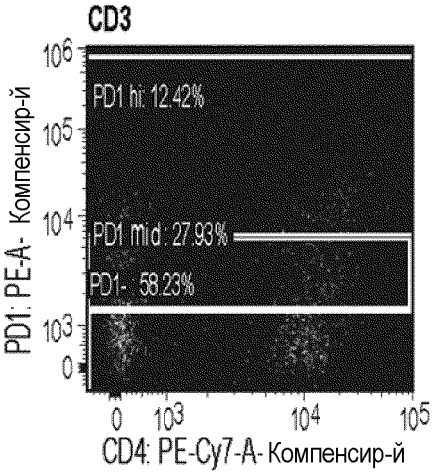


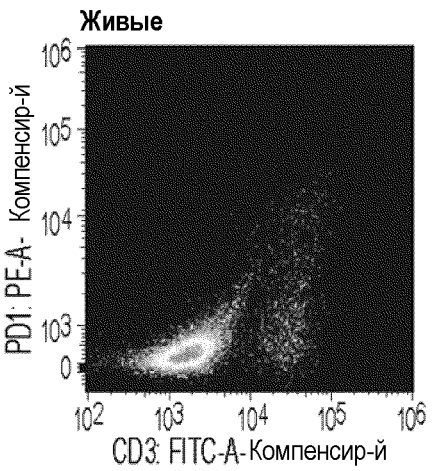
Гейты и статистика Отображение 100000 / 1239610 событий

Название	События	%Исходн.	% Всего	
□ Все события	100,000	0.00%	100.00%	
□ C	56,105	56.11%	56.11%	
□ D	25,806	46.00%	25.81%	
□ Живые	20,576	79.73%	20.58%	
□ CD3	1,264	6.14%	1.26%	
□ PD1 hi	157	12.42%	0.16%	
□ PD1-	736	58.23%	0.74%	
□ PD1 mid	353	27.93%	0.35%	
□ J	12,686	12.69%	12.69%	



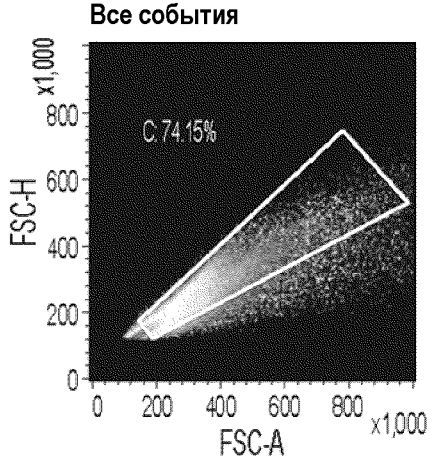


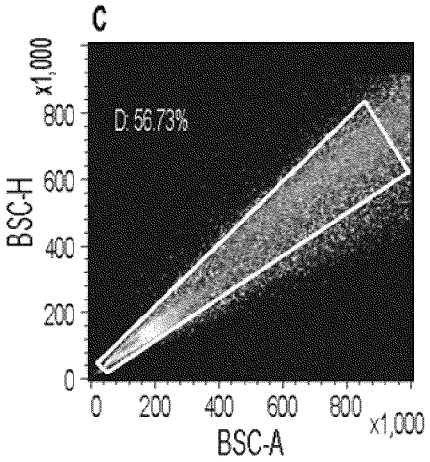




ФИГ. 158S

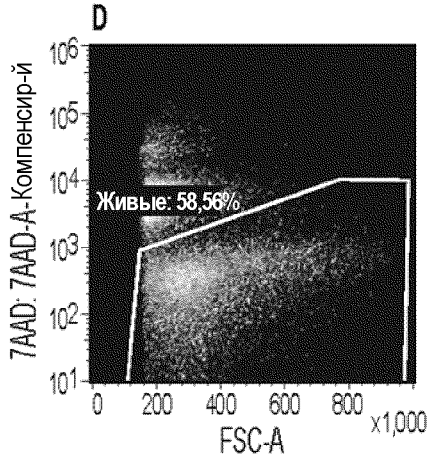
Рабочий лист

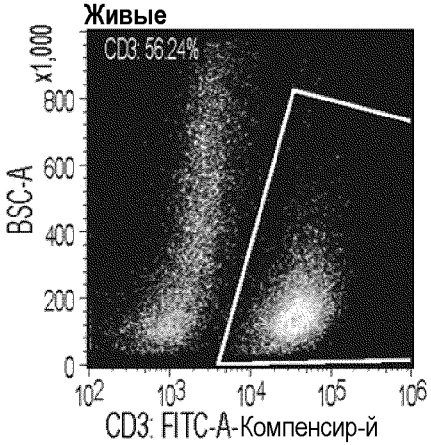


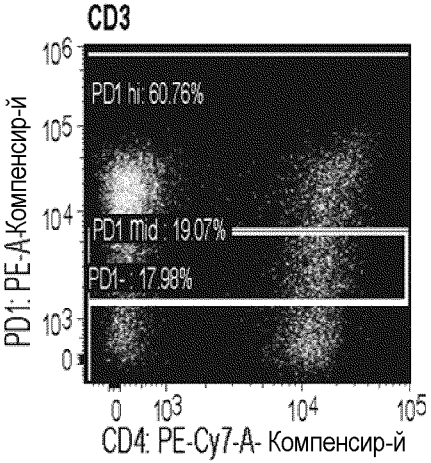


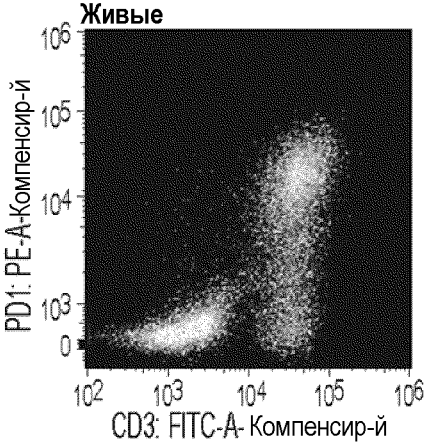
Гейты и статистика Отображение 100000 / 216581 событий

Название	События	%Исходн.	% Всего
Все события	100,000	0.00%	100.00%
C	74,151	74.15%	74.15%
D	42,064	56.73%	42.06%
Живые	24,634	58.56%	24.63%
CD3	13,854	56.24%	13.85%
PD1 hi	8,417	60.76%	8.42%
PD1-	2,491	17.98%	2.49%
PD1 Mid	2,729	19.70%	2.73%
J	17,974	17.97%	17.97%





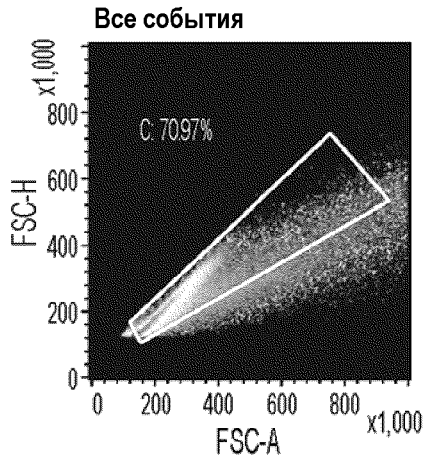


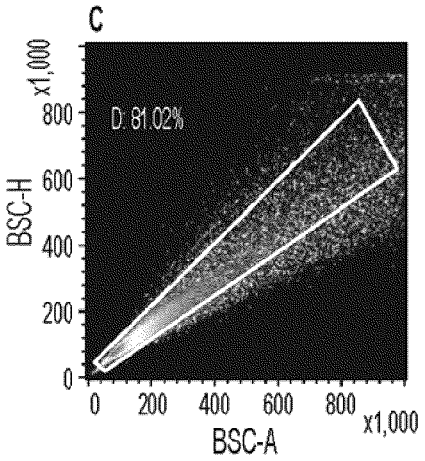


ФИГ. 158T

user1/190301 M1139/Super Sort/M1136 sort2 ([2 Way] Data Source - 1)

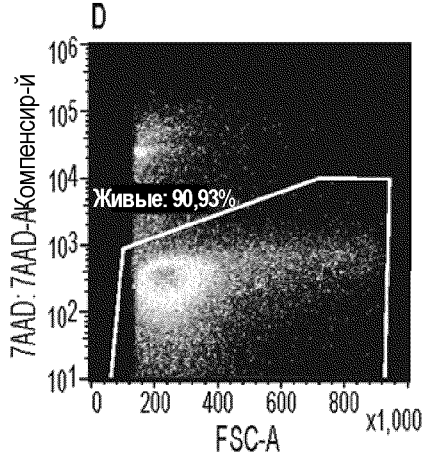
Рабочий лист

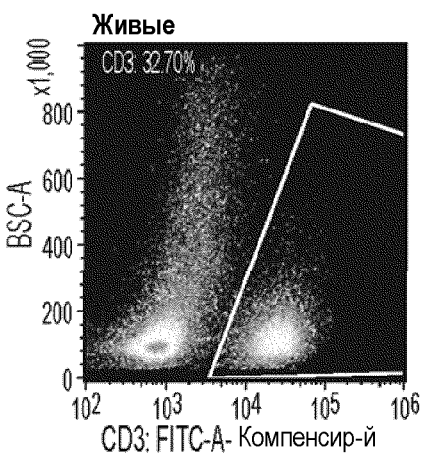


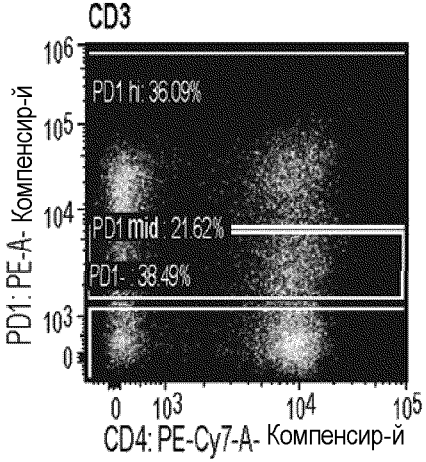


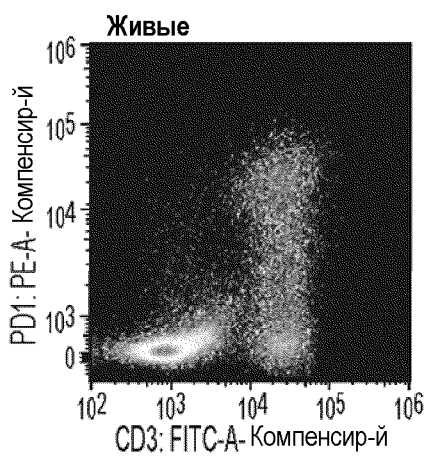
Гейты и статистика Отображение 100000 / 175650 событий

Название	События	%Исходн.	% Всего	
Все события	100,000	0.00%	100.00%	
C	70,968	70.97%	70.97%	
D	57,501	81.02%	57.50%	
Живые	52,285	90.93%	52.29%	
CD3	17,097	32.70%	17.10%	
PD1 hi	6,170	36.09%	6.17%	
PD1-	6,580	38.49%	6.58%	
PD1 mid	3,697	21.62%	3.70%	
J	35,775	35.78%	35.78%	



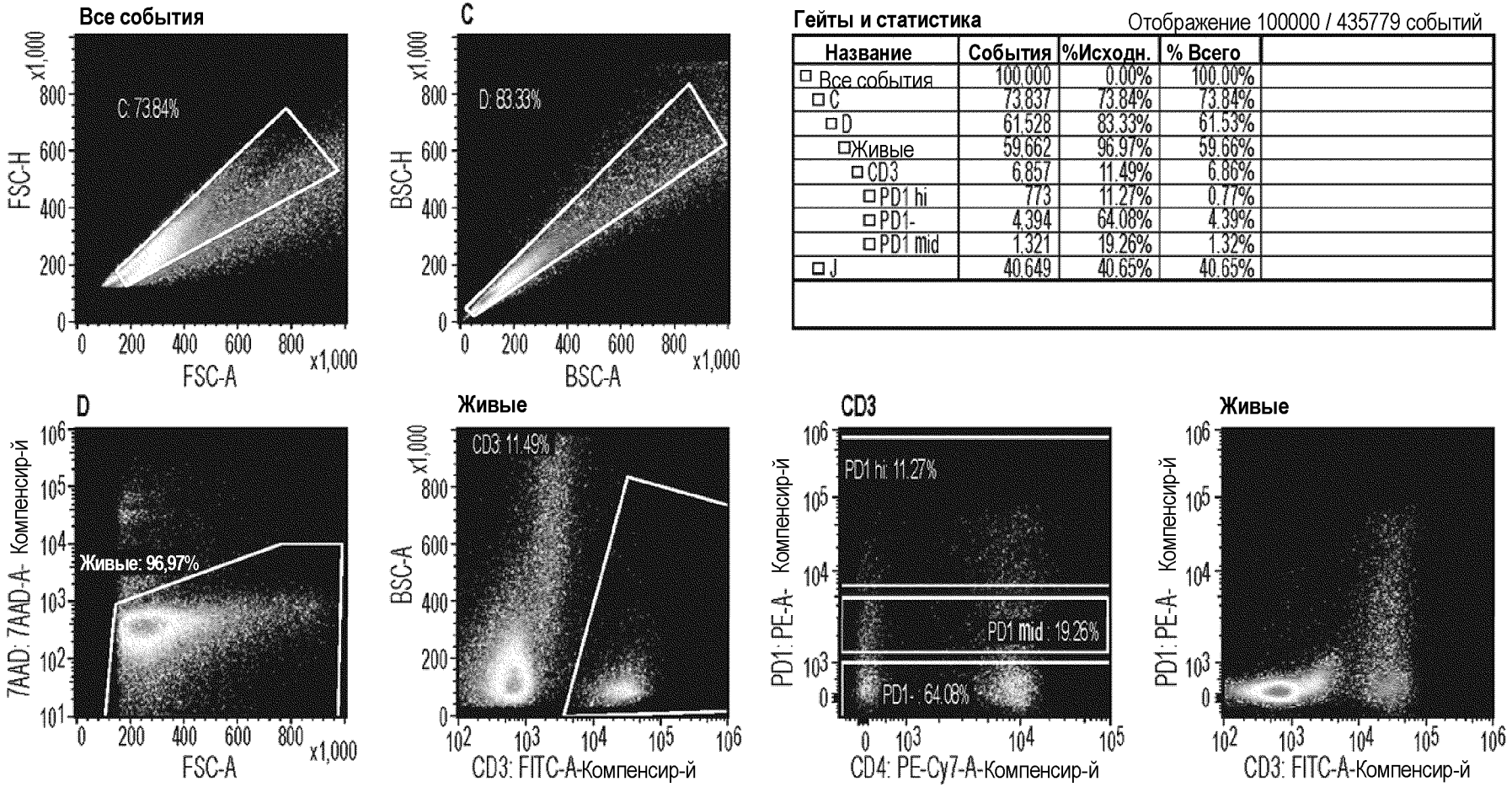






ФИГ. 158U

Рабочий лист

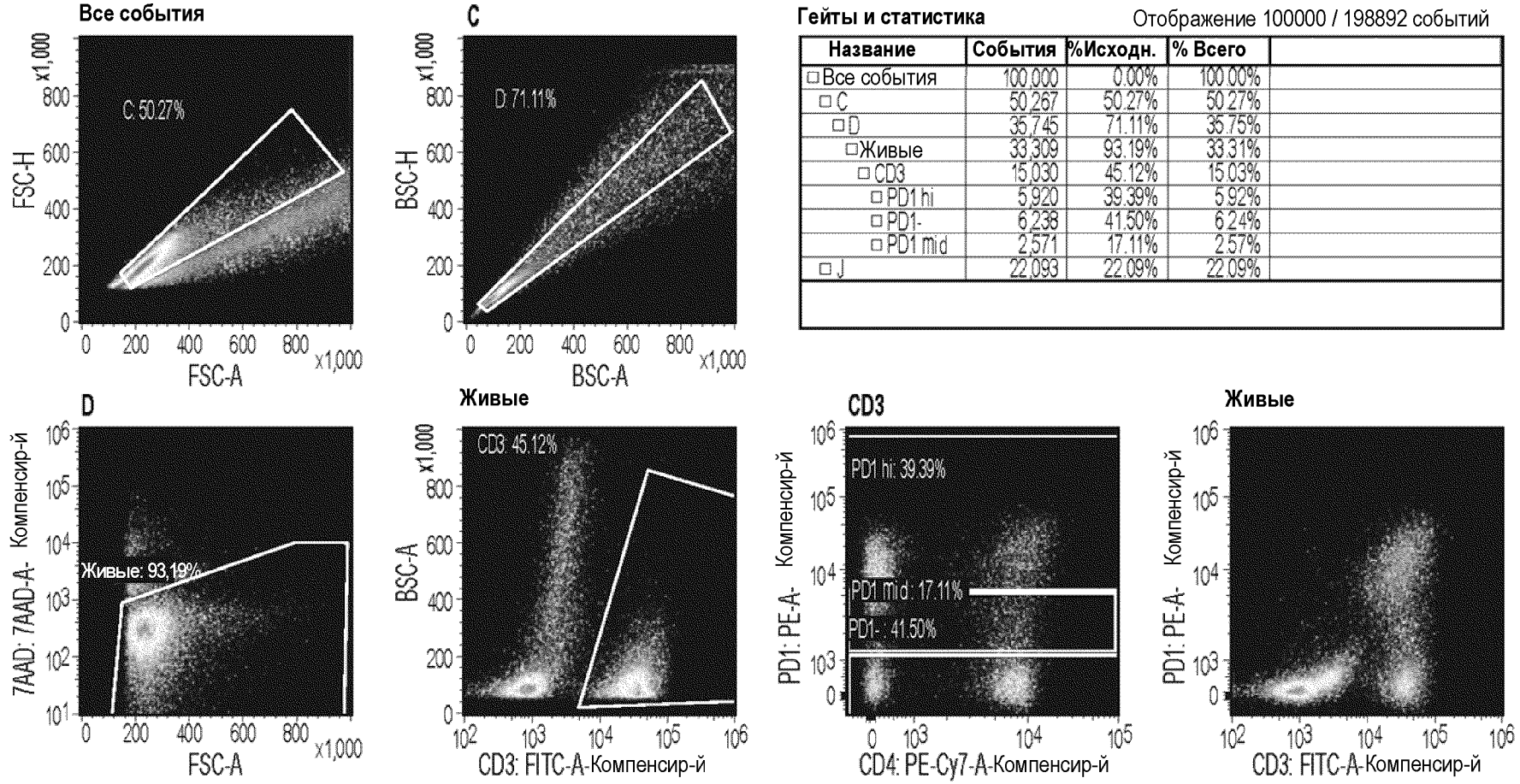


Гейты и статистика Отображение 100000 / 435779 событий

Название	События	%Исходн.	% Всего
Все события	100,000	0.00%	100.00%
C	73,837	73.84%	73.84%
D	61,528	83.33%	61.53%
Живые	59,662	96.97%	59.66%
CD3	6,857	11.49%	6.86%
PD1 hi	773	11.27%	0.77%
PD1-	4,394	64.08%	4.39%
PD1 mid	1,321	19.26%	1.32%
J	40,649	40.65%	40.65%

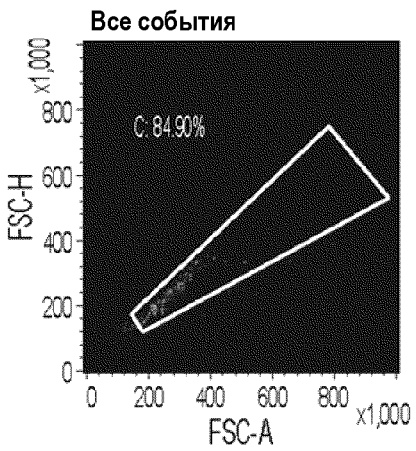
ФИГ. 158V

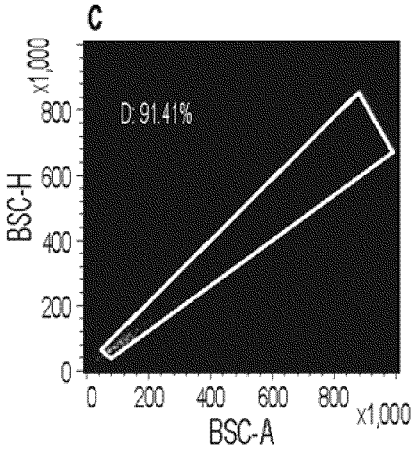
Рабочий лист



ФИГ. 158W

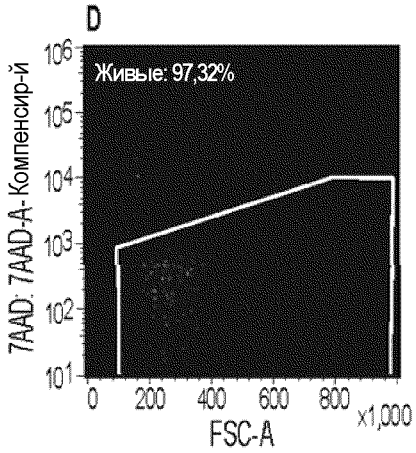
Рабочий лист

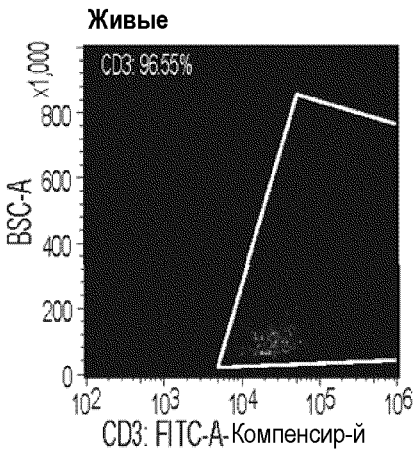


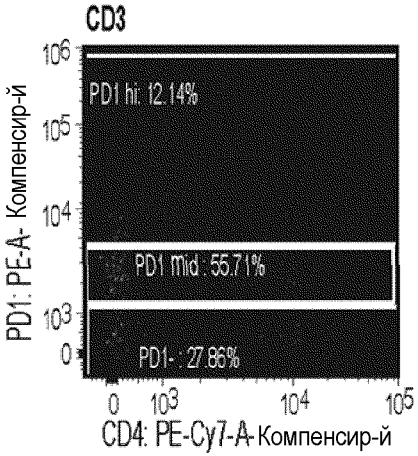


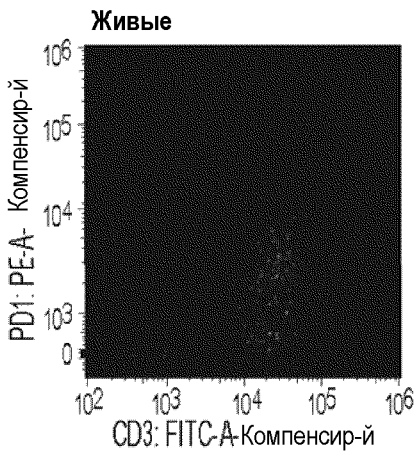
Гейты и статистика

Название	События	%Исходн.	% Всего
Все события	192	0.00%	100.00%
C	163	84.90%	84.90%
D	149	91.41%	77.60%
Живые	145	97.32%	75.52%
CD3	140	96.55%	72.92%
PD1 hi	17	12.14%	8.85%
PD1-	39	27.86%	20.31%
PD1 mid	78	55.71%	40.63%
J	114	59.38%	59.38%



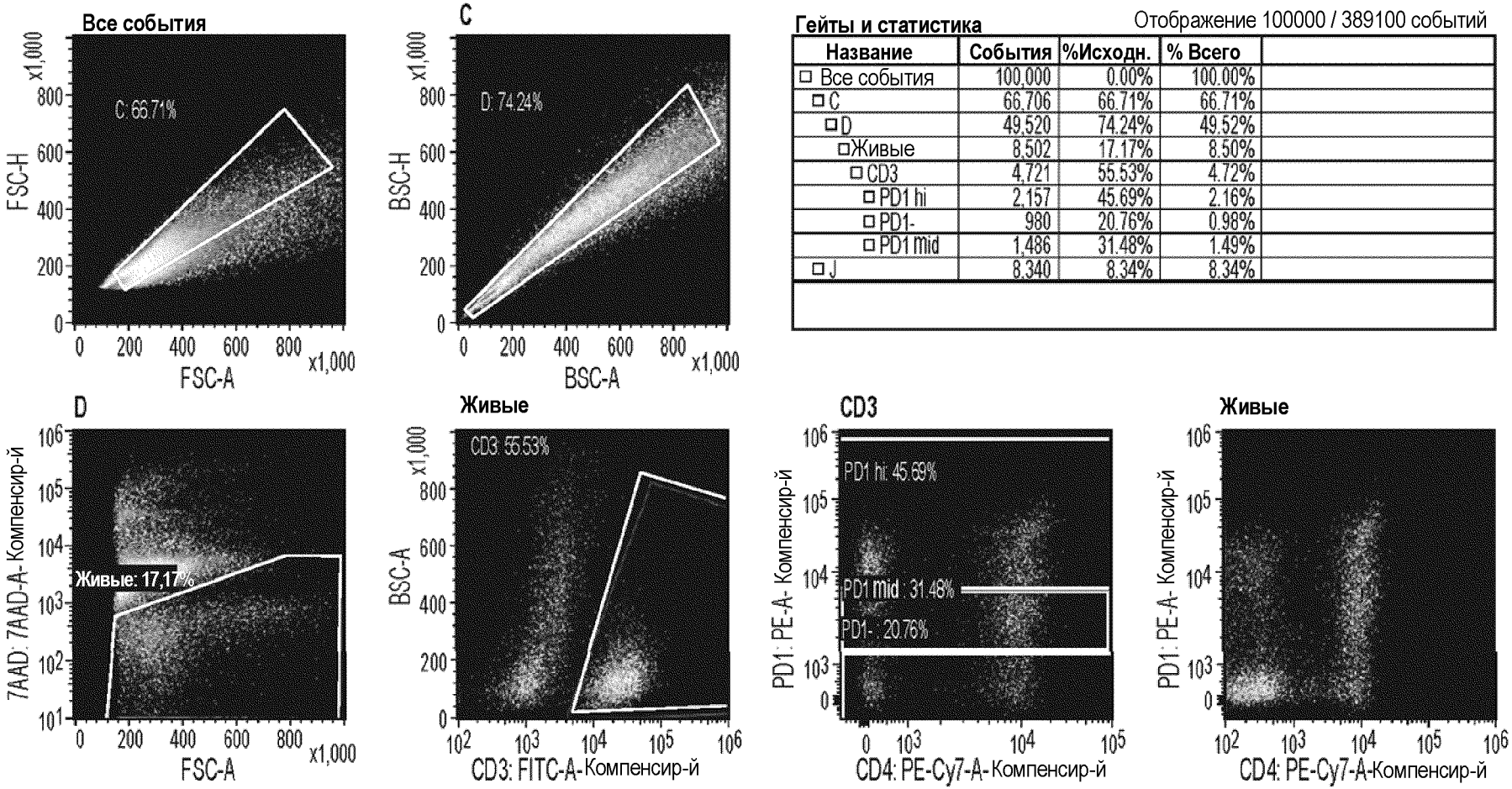






ФИГ. 158X

Рабочий лист

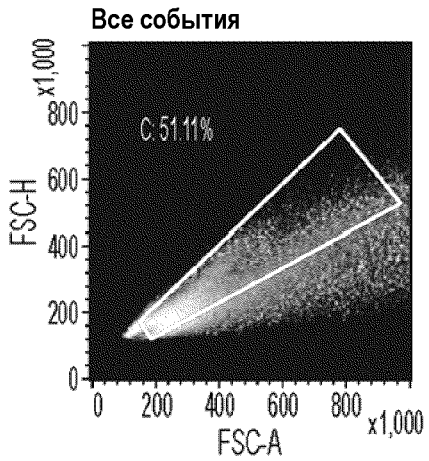


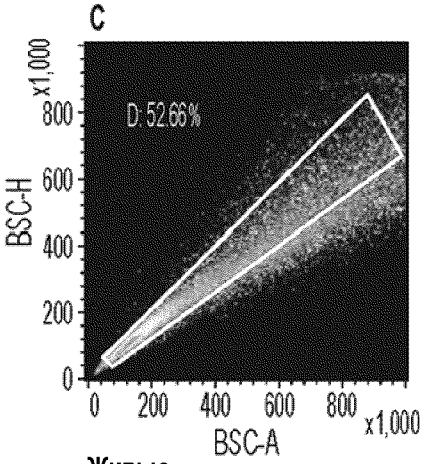
Гейты и статистика Отображение 100000 / 389100 событий

Название	События	%Исходн.	% Всего
Все события	100,000	0.00%	100.00%
C	66,706	66.71%	66.71%
D	49,520	74.24%	49.52%
Живые	8,502	17.17%	8.50%
CD3	4,721	55.53%	4.72%
PD1 hi	2,157	45.69%	2.16%
PD1-	980	20.76%	0.98%
PD1 mid	1,486	31.48%	1.49%
J	8,340	8.34%	8.34%

ФИГ. 158Y

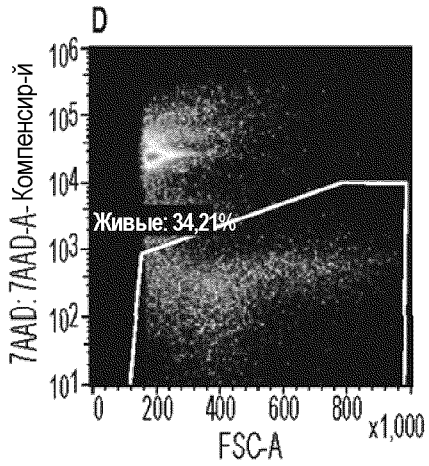
Рабочий лист

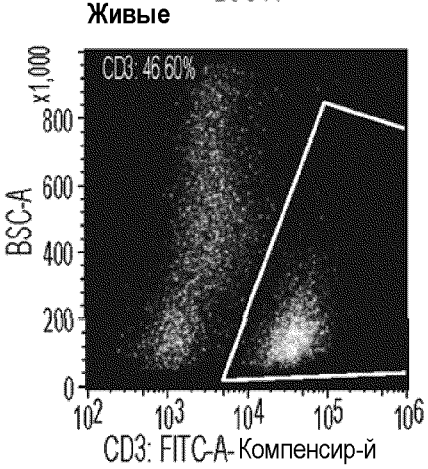


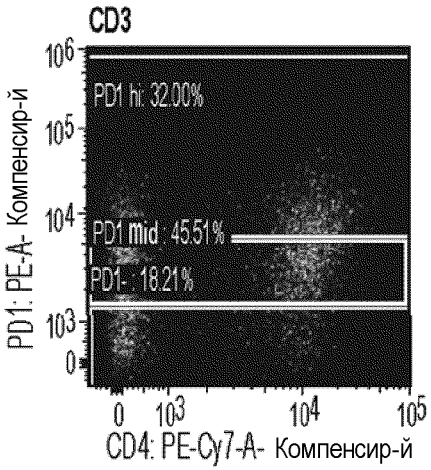


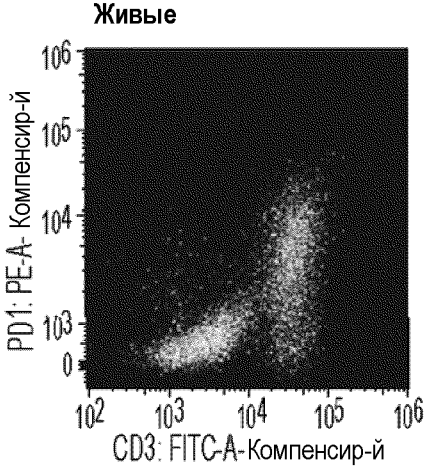
Гейты и статистика Отображение 100000 / 693862 событий

Название	События	%Исходн.	% Всего	
Все события	100.000	0.00%	100.00%	
C	51.109	51.11%	51.11%	
D	26.916	52.66%	26.92%	
Живые	9.209	34.21%	9.21%	
CD3	4.300	46.69%	4.30%	
PD1 hi	1.376	32.00%	1.38%	
PD1-	783	18.21%	0.78%	
PD1 mid	1.957	45.51%	1.96%	
J	10.222	10.22%	10.22%	



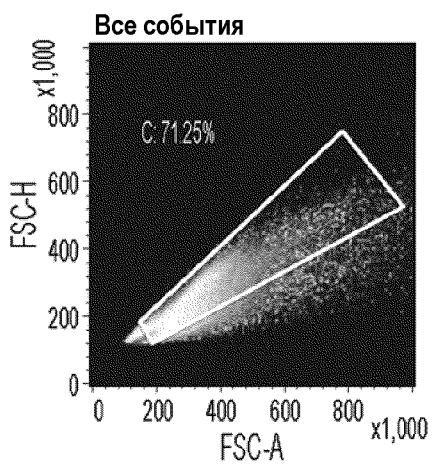


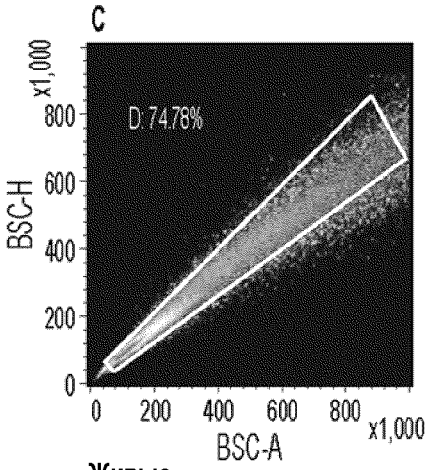




ФИГ. 158Z

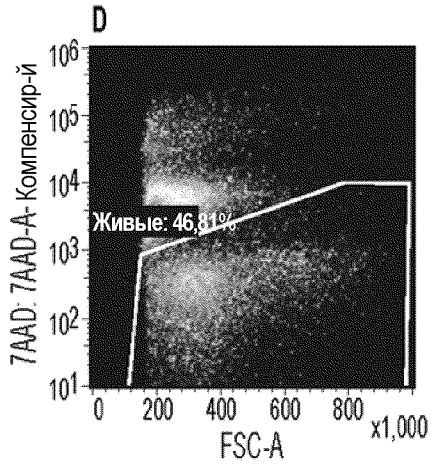
Рабочий лист

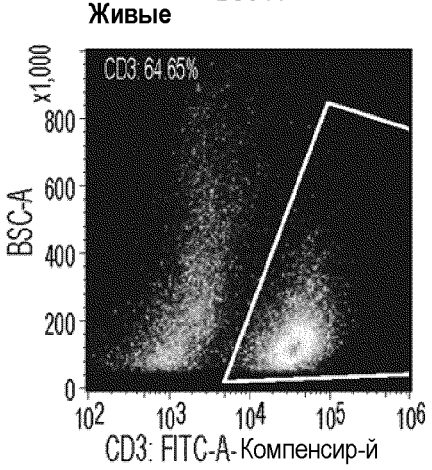


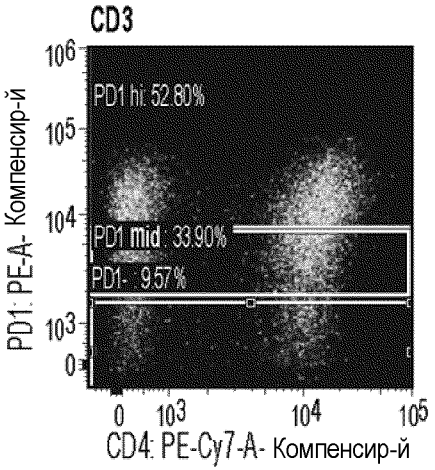


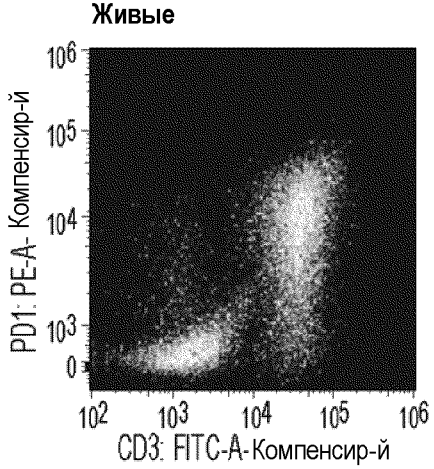
Гейты и статистика Отображение 100000 / 191392 событий

Название	События	%Исходн.	% Всего
Все события	100,000	0.00%	100.00%
C	71,247	71.25%	71.25%
D	53,280	74.78%	53.28%
Живые	24,938	46.81%	24.94%
CD3	16,122	64.65%	16.12%
PD1 hi	8,512	52.80%	8.51%
PD1-	1,543	9.57%	1.54%
PD1 mid	5,466	33.90%	5.47%
J	22,012	22.01%	22.01%



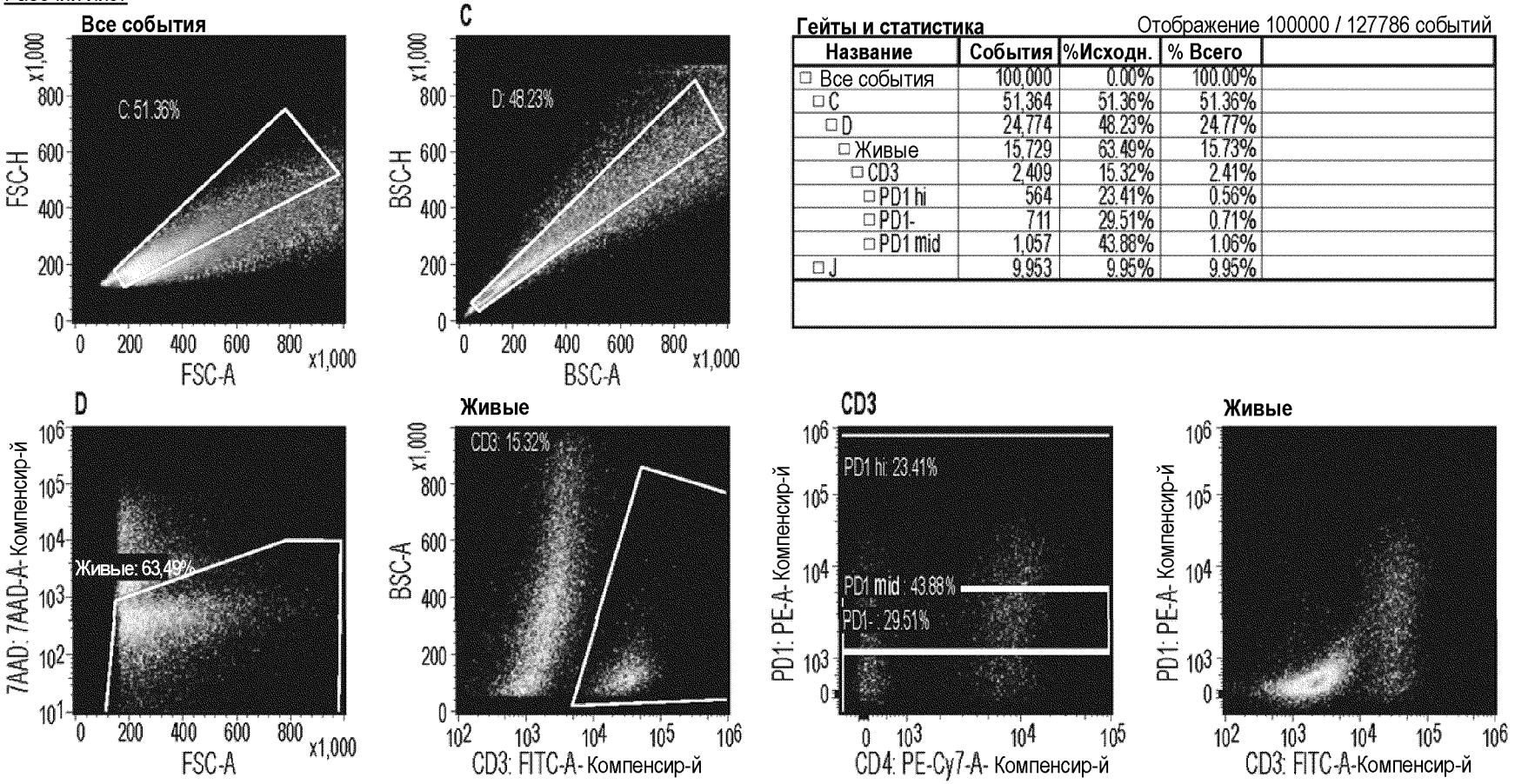






ФИГ. 158AA

Рабочий лист

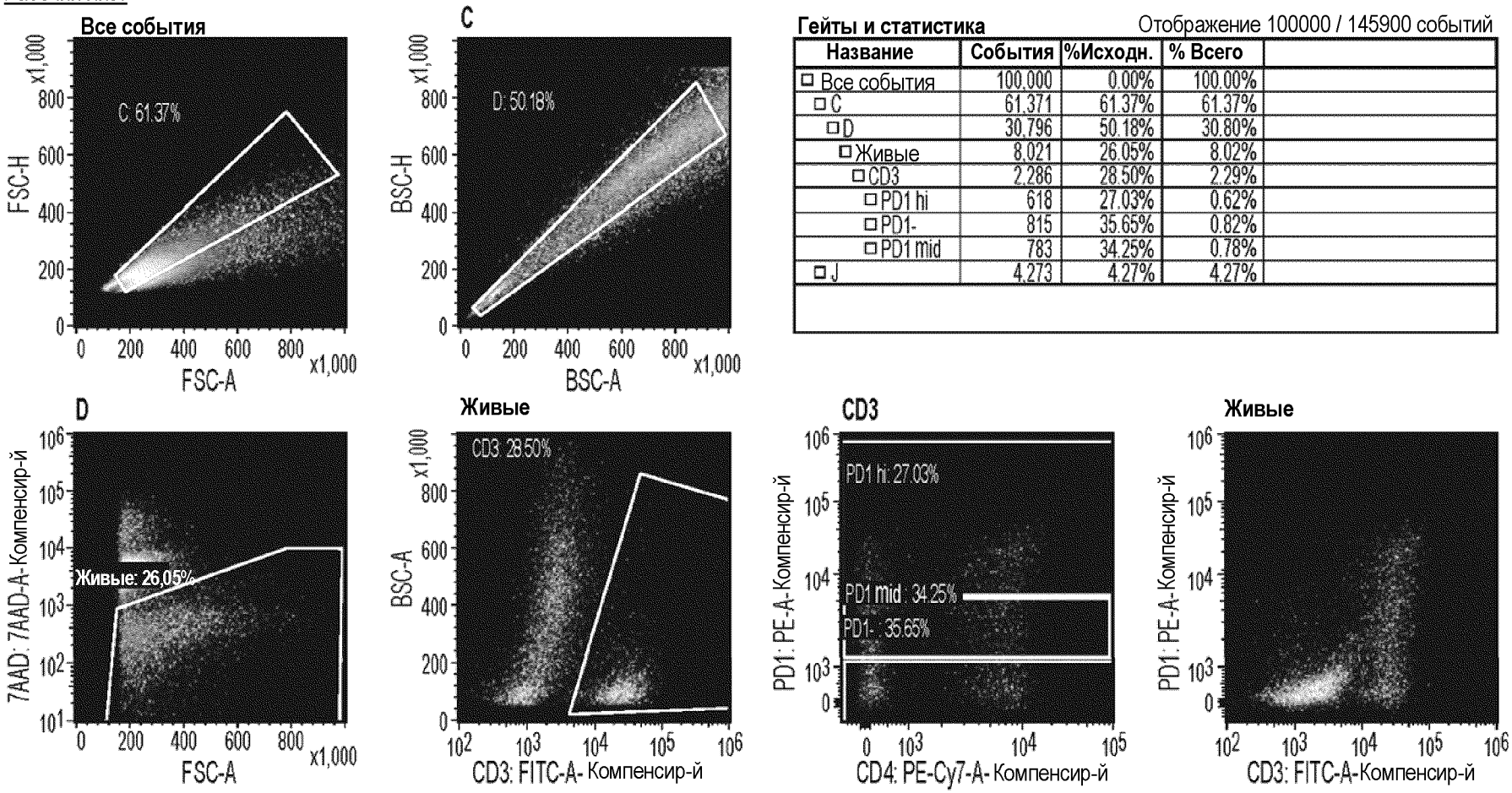


Гейты и статистика Отображение 100000 / 127786 событий

Название	События	%Исходн.	% Всего
Все события	100,000	0.00%	100.00%
C	51,364	51.36%	51.36%
D	24,774	48.23%	24.77%
Живые	15,729	63.49%	15.73%
CD3	2,409	15.32%	2.41%
PD1 hi	564	23.41%	0.56%
PD1-	711	29.51%	0.71%
PD1 mid	1,057	43.88%	1.06%
J	9,953	9.95%	9.95%

ФИГ. 158BB

Рабочий лист

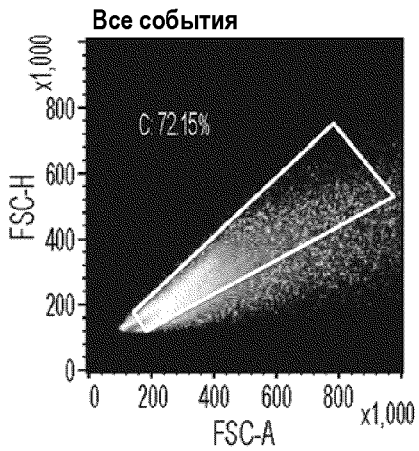


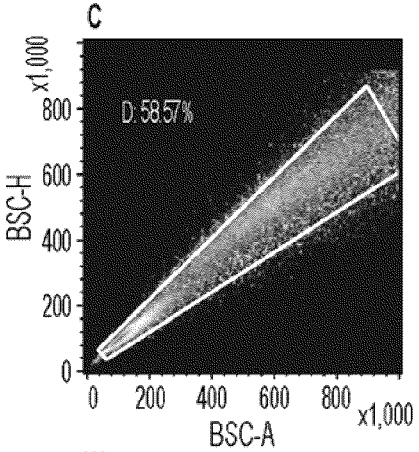
Гейты и статистика Отображение 100000 / 145900 событий

Название	События	%Исходн.	% Всего	
Все события	100,000	0.00%	100.00%	
C	61,371	61.37%	61.37%	
D	30,796	50.18%	30.80%	
Живые	8,021	26.05%	8.02%	
CD3	2,286	28.50%	2.29%	
PD1 hi	618	27.03%	0.62%	
PD1-	815	35.65%	0.82%	
PD1 mid	783	34.25%	0.78%	
J	4,273	4.27%	4.27%	

ФИГ. 158CC

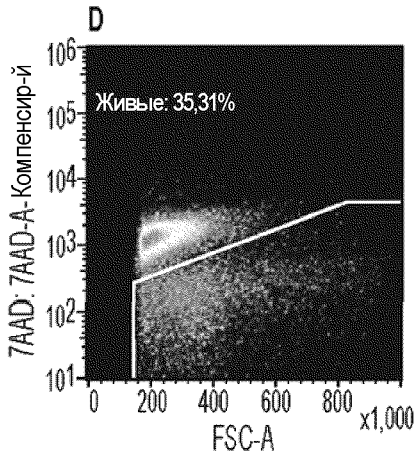
Рабочий лист

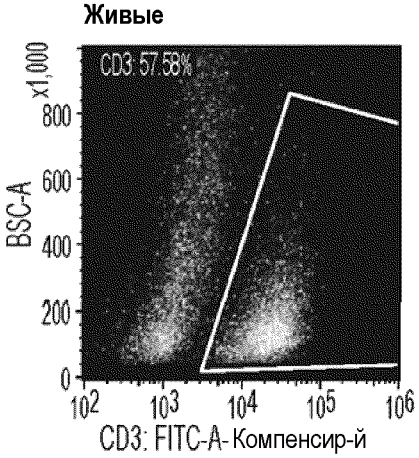


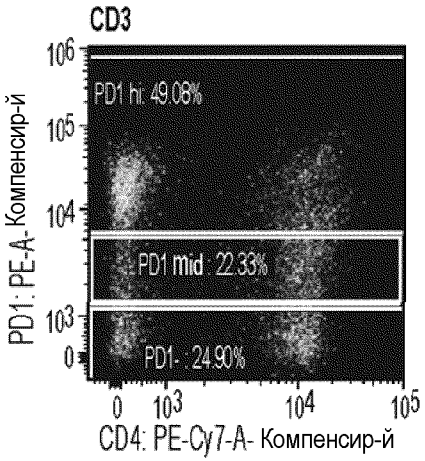


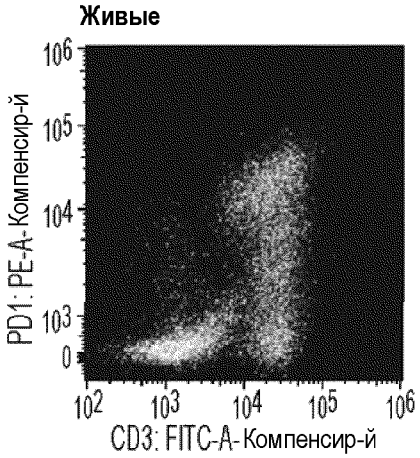
Гейты и статистика Отображение 100000 / 351880 событий

Название	События	%Исходн.	% Всего	
Все события	100,000	0.00%	100.00%	
C	72,145	72.15%	72.15%	
D	42,254	58.57%	42.25%	
Живые	14,921	35.31%	14.92%	
CD3	8,592	57.58%	8.59%	
PD1 hi	4,217	49.08%	4.22%	
PD1-	2,139	24.90%	2.14%	
PD1 mid	1,919	22.33%	1.92%	
J	11,157	11.16%	11.16%	



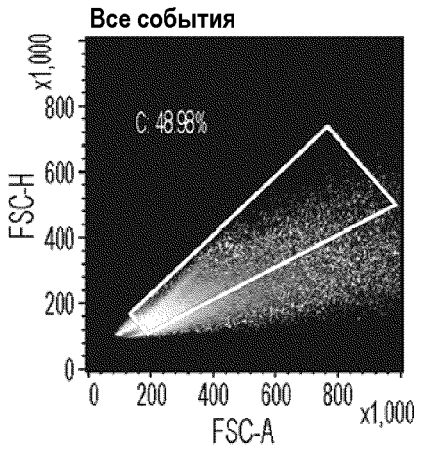


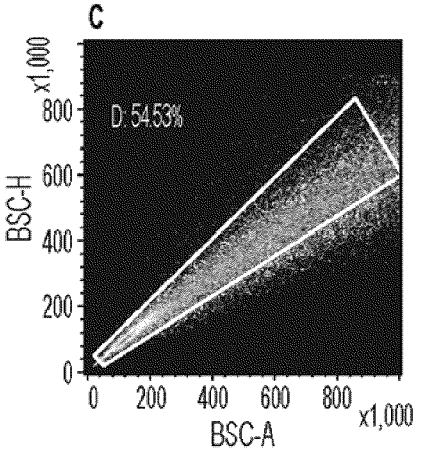




ФИГ. 158DD

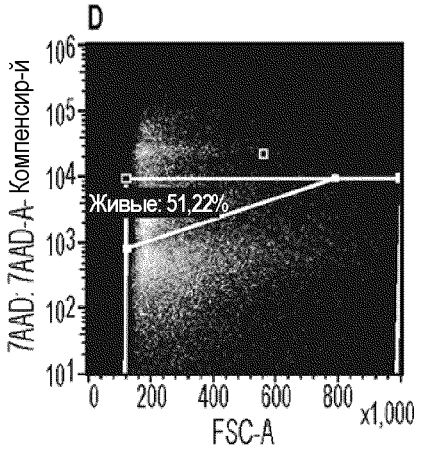
Рабочий лист

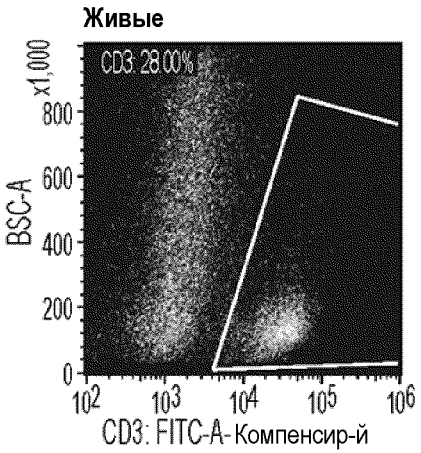


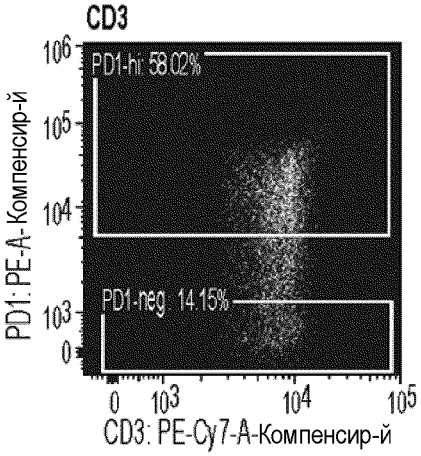


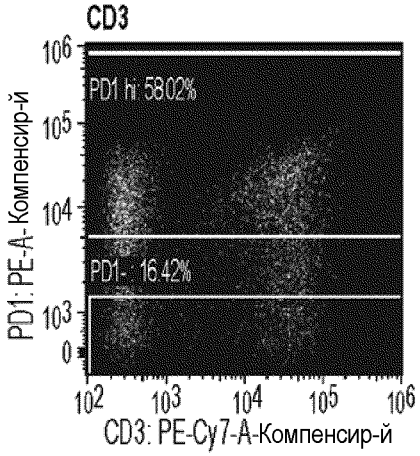
Гейты и статистика Отображение 100000 / 353664 событий

Название	События	%Исходн.	% Всего
Все события	100,000	0.00%	100.00%
C	48,975	48.98%	48.98%
D	26,705	54.53%	26.71%
Живые	13,677	51.22%	13.68%
CD3	3,830	28.00%	3.83%
PD1 hi	2,222	58.02%	2.22%
PD1-	629	16.42%	0.63%
PD1-hi	2,222	58.02%	2.22%
PD1 neg	542	14.15%	0.54%
J	5,636	5.64%	5.64%





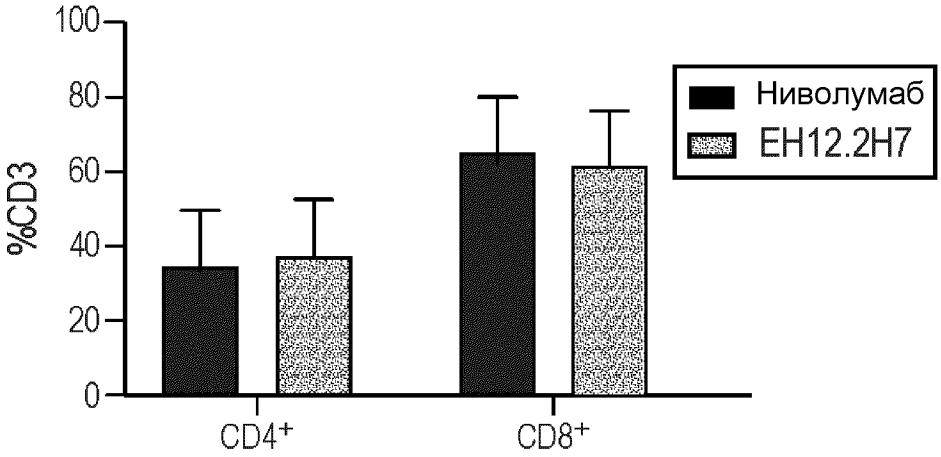




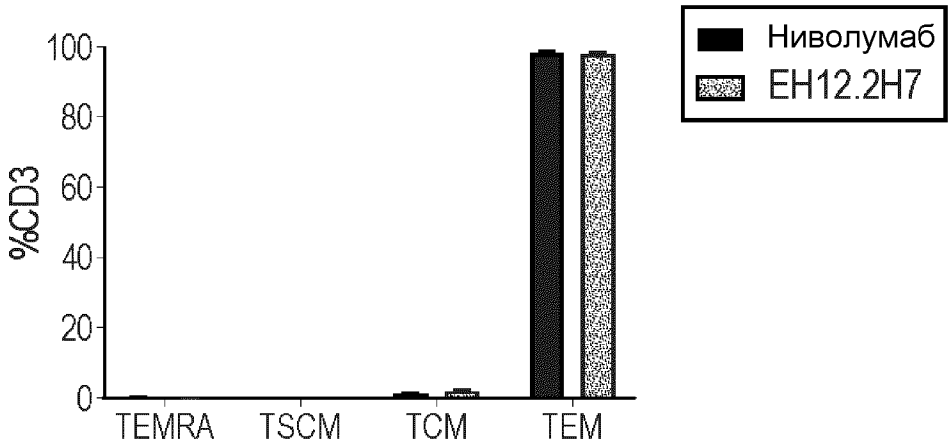
ФИГ. 158EE

	FSC, отдельные клетки/SSC, отдельные клетки/Живые/CD3 | частота от исходных	FSC, отдельные клетки/SSC, отдельные клетки/Живые/CD3 | PD1high | частота от исходных
B3 CC10026.fcs	15.4%	32.5%
B4 CC10027.fcs	16.8%	31.6%
B5 PD-1 FMO.fcs	34.4%	0%
B6 PBMC.fcs	16.9%	4.52%
Среднее	20.9%	17.2%
СКО	9.04%	17.3%

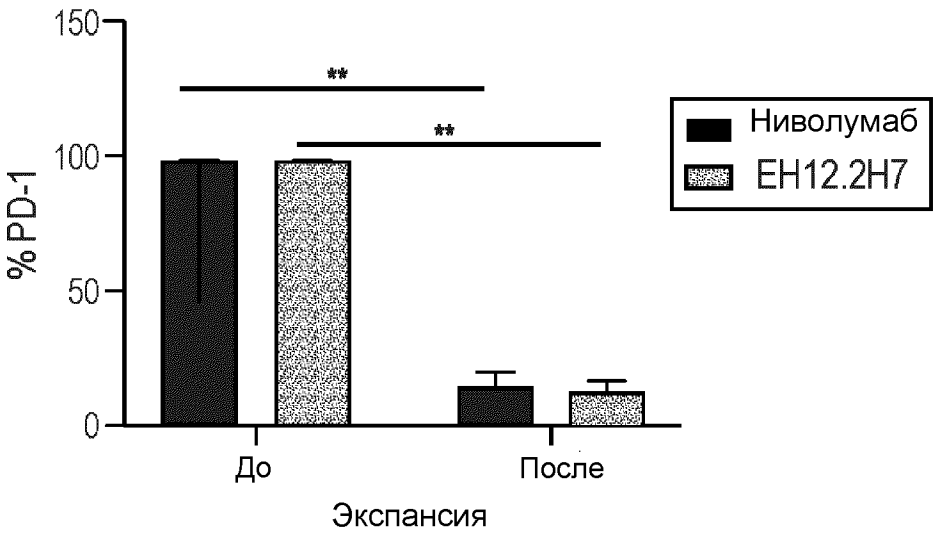
ФИГ. 158FF



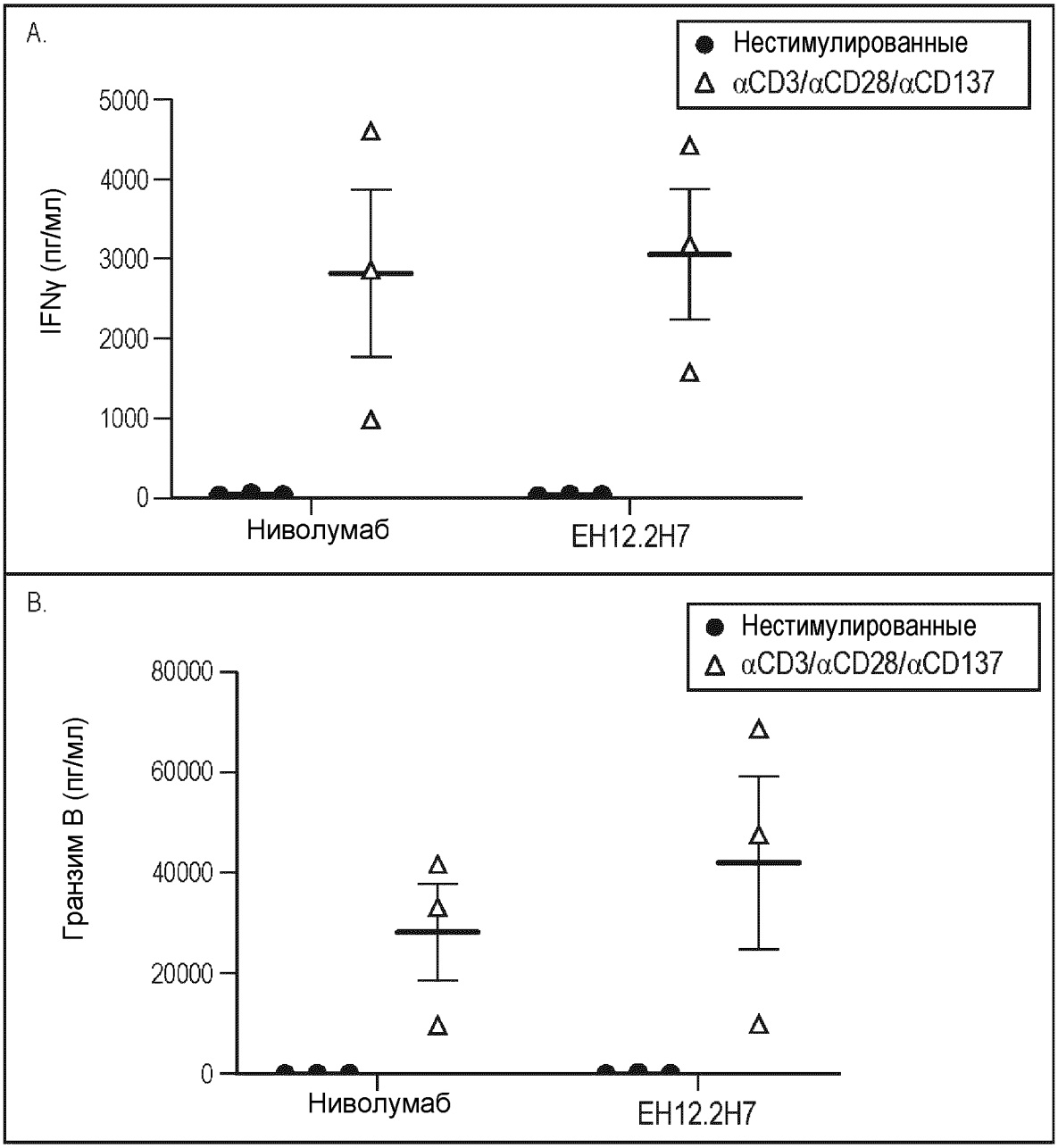
ФИГ. 159



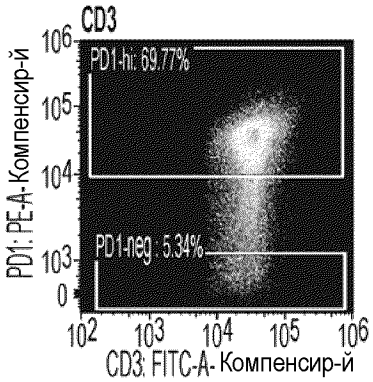
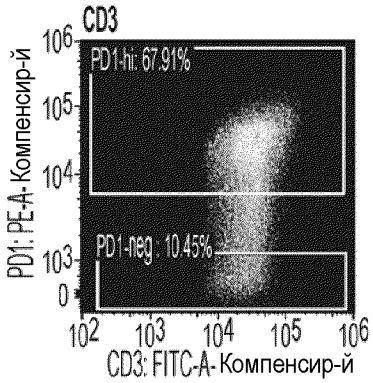
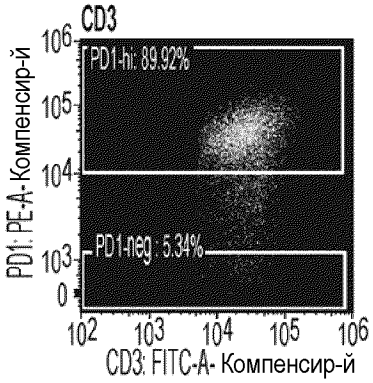
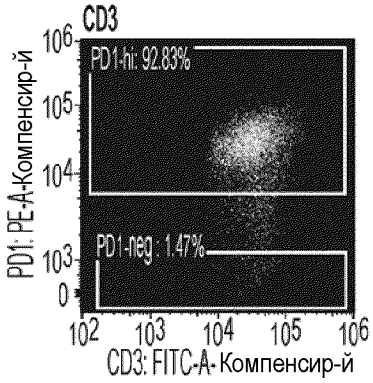
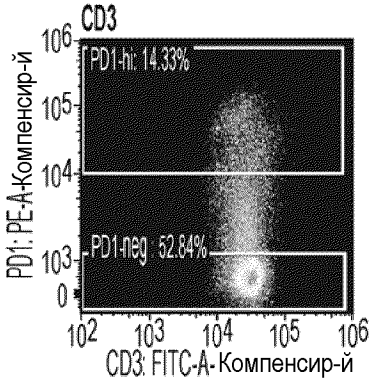
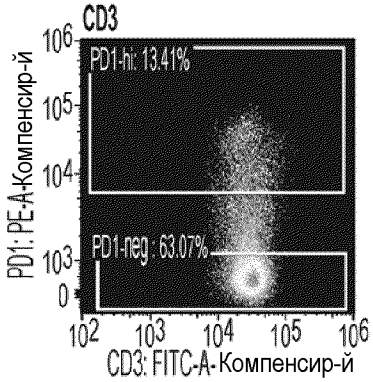
ФИГ. 160



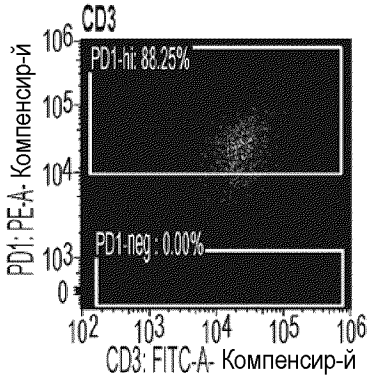
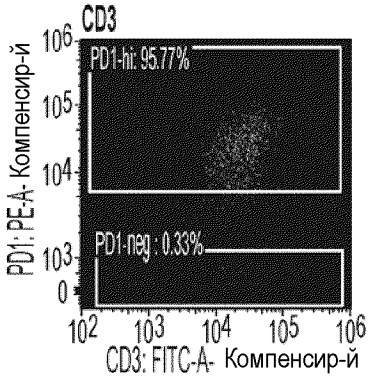
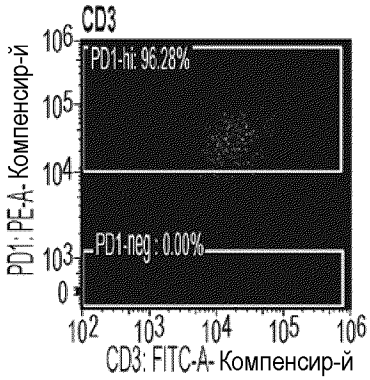
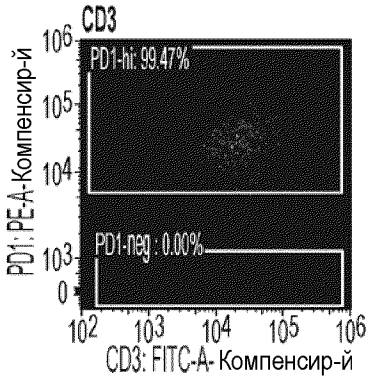
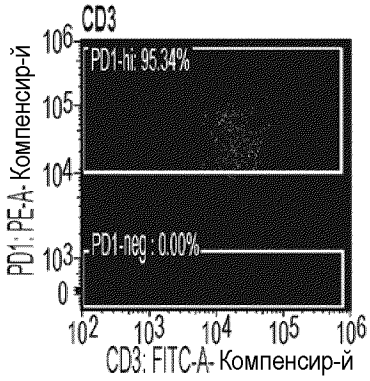
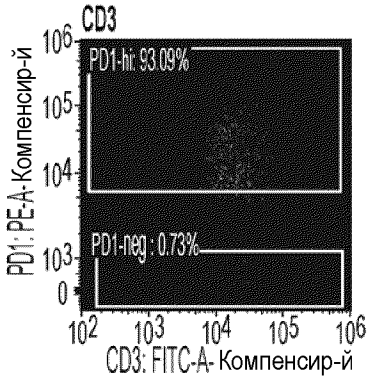
ФИГ. 161А


A.
Нестимулированные
αCD3/αCD28/αCD137
IFNγ (пг/мл)
5000
4000
3000
2000
1000
0
Ниволумаб
EH12.2H7
B.
Нестимулированные
αCD3/αCD28/αCD137
Гранзим B (пг/мл)
80000
60000
40000
20000
0
Ниволумаб
EH12.2H7

ФИГ. 161B

	Ниволумаб	EH12.2H7
Яичника		
Меланома		
ПКГШ		

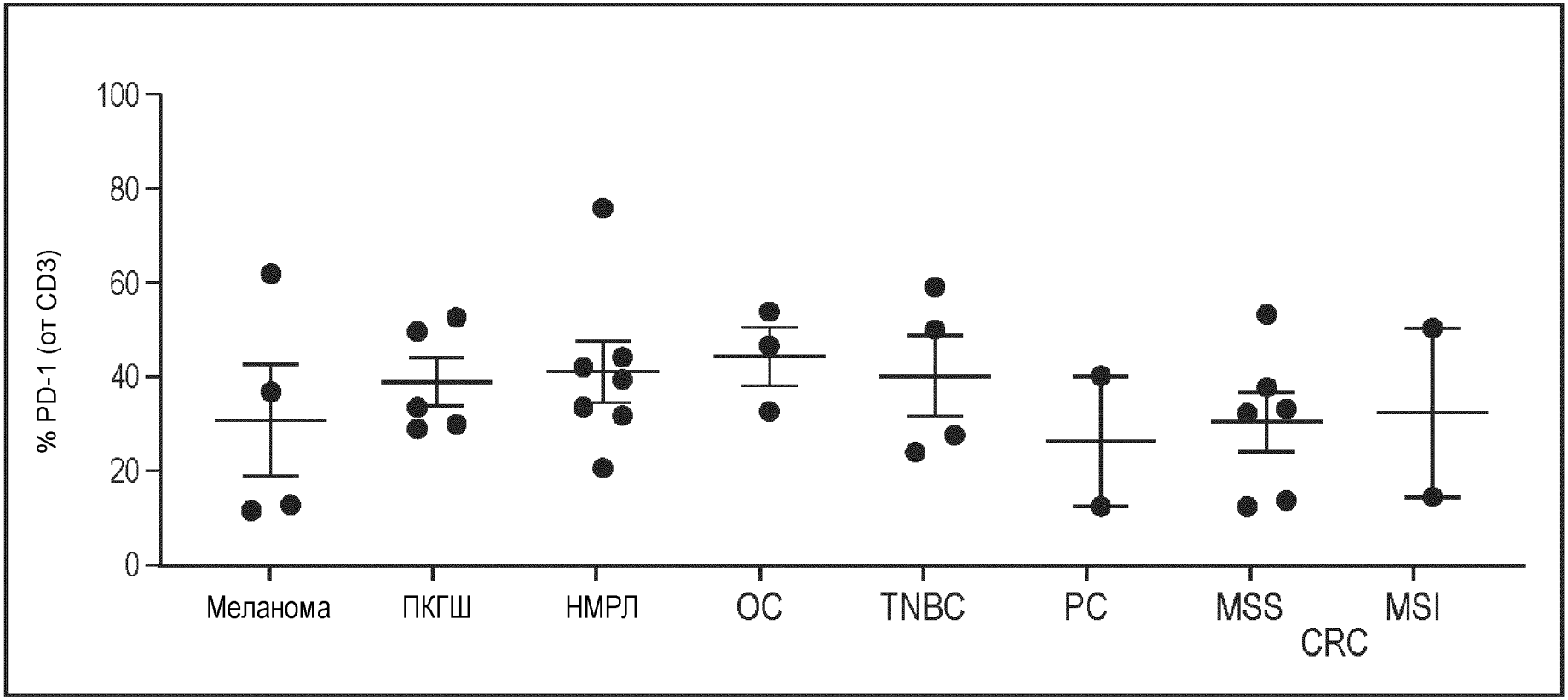
ФИГ. 162

	Ниволумаб	EH12.2H7
Яичника		
Меланома		
ПКГШ		

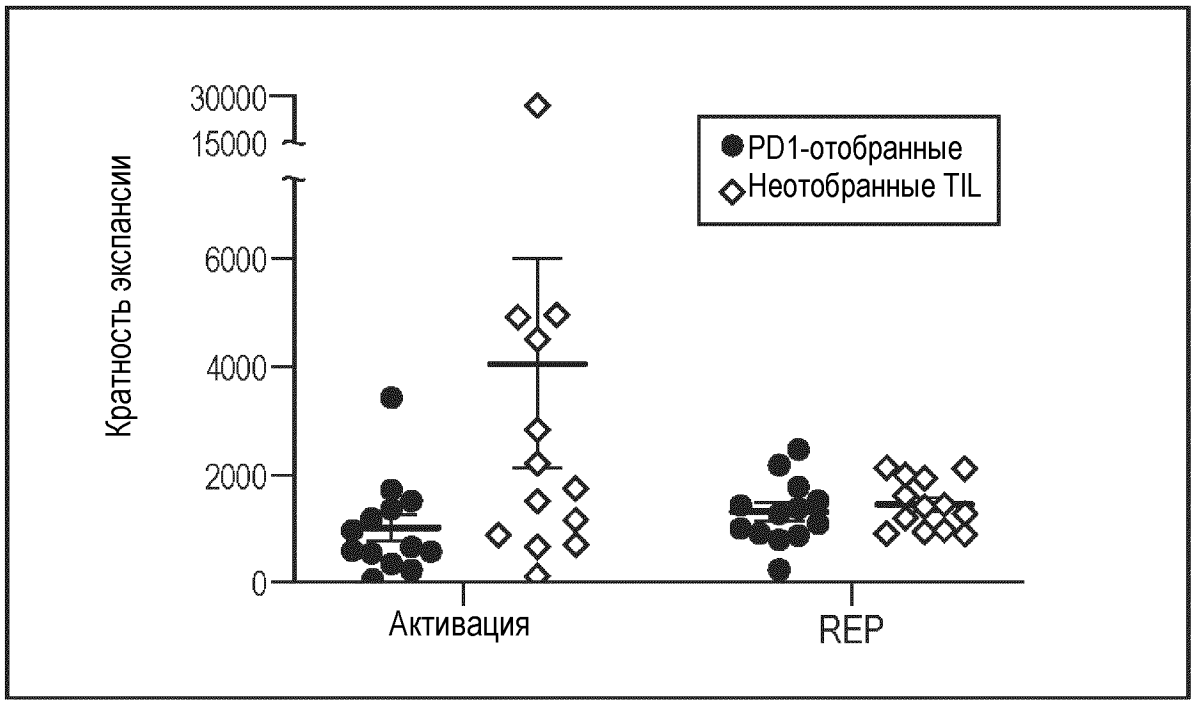
ФИГ. 163

Название образца	Количество клеток и жизнеспособность													
	Объем (мл)	Количество 1		Количество 2		Количества 1 и 2 в пределах 10% от среднего?	Количество 3		Количество 4		Количества 3 и 4 в пределах 10% от среднего?	Среднее		
		Жизнеспособных клеток/мл	% жизнеспособности	Жизнеспособных клеток/мл	% жизнеспособности		Жизнеспособных клеток/мл	% жизнеспособности	Жизнеспособных клеток/мл	% жизнеспособности		Жизнеспособных клеток/мл	% жизнеспособности	Общее кол-во жизнеспособных клеток
Ниволумаб, стабильность через 120 ч, исходный уровень, объем 30 С1	30	4,75E+07	90,9	5,40E+07	89,8	ДА	5,56E+07	91,40	5,71E+07	91,40	ДА	5,36E+07	90,88	1,61E+09

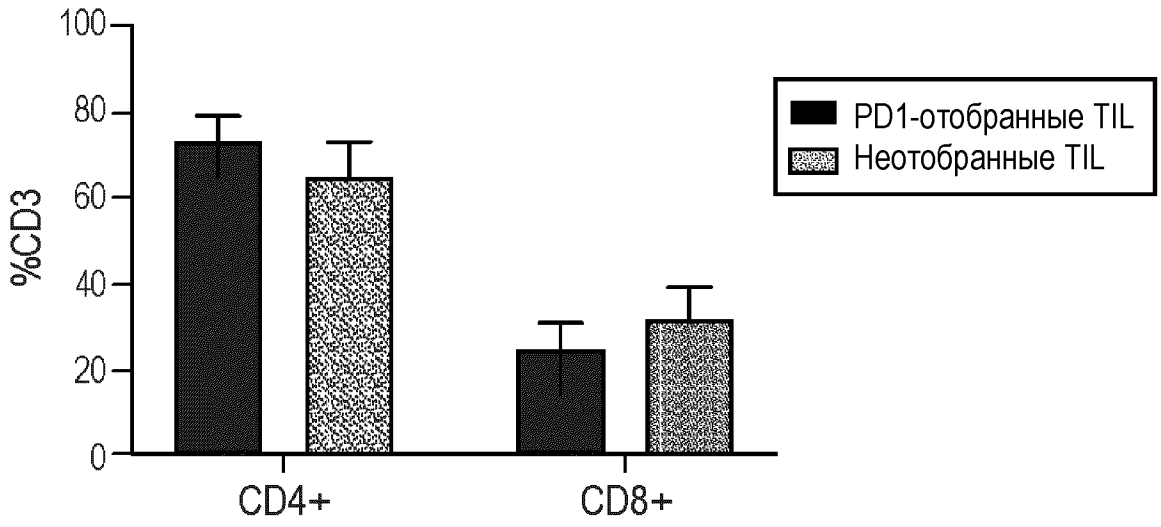
ФИГ. 164


% PD-1 (от CD3)
100
80
60
40
20
0
Меланома
ПКГШ
НМРЛ
ОС
TNBC
РС
MSS
MSI
CRC

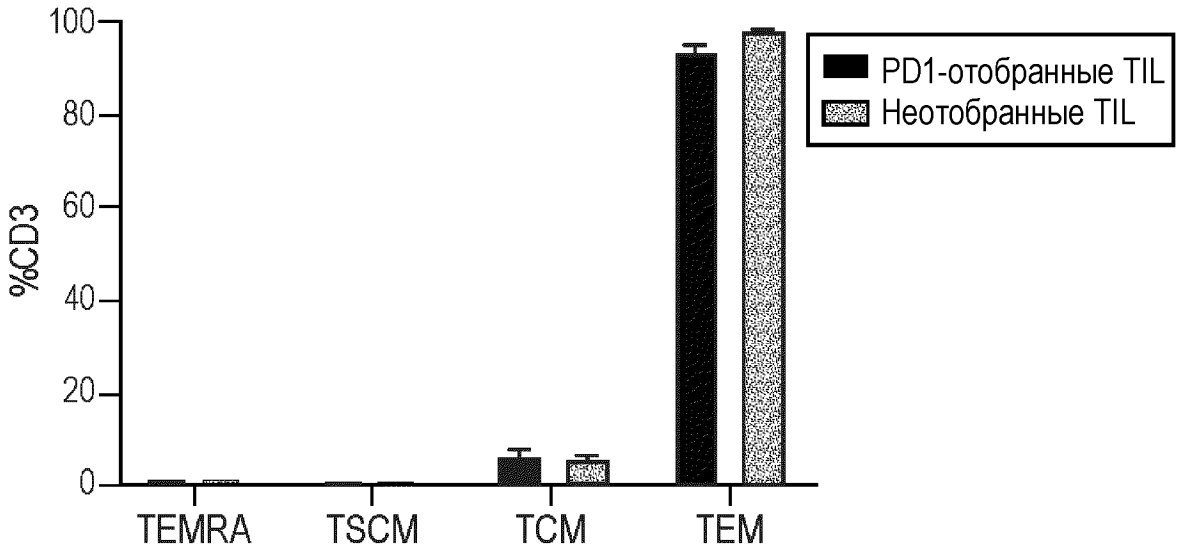
ФИГ. 165


30000
15000
6000
4000
2000
0
Кратность экспансии
PD1-отобранные
Неотобранные TIL
Активация
REP

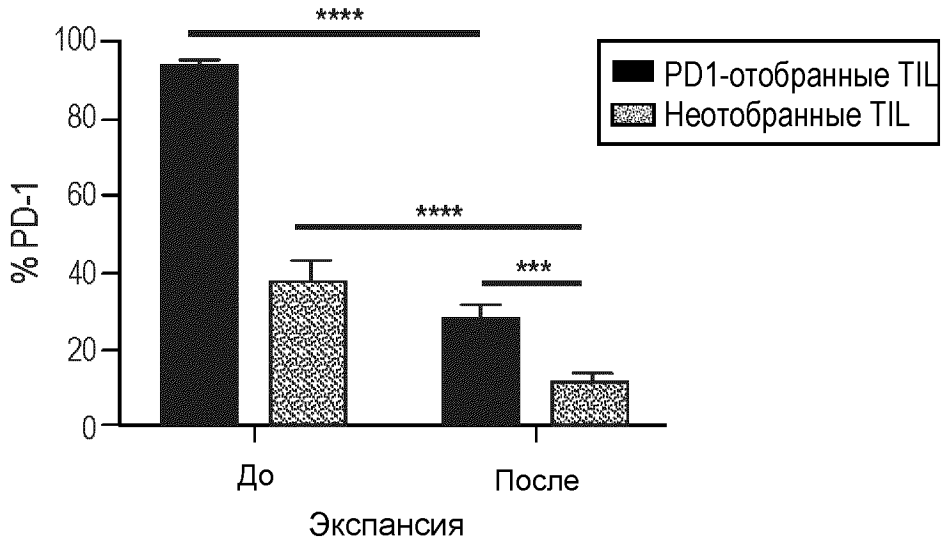
ФИГ. 166


100
80
60
40
20
0
%CD3
CD4+
CD8+
PD1-отобранные TIL
Неотобранные TIL

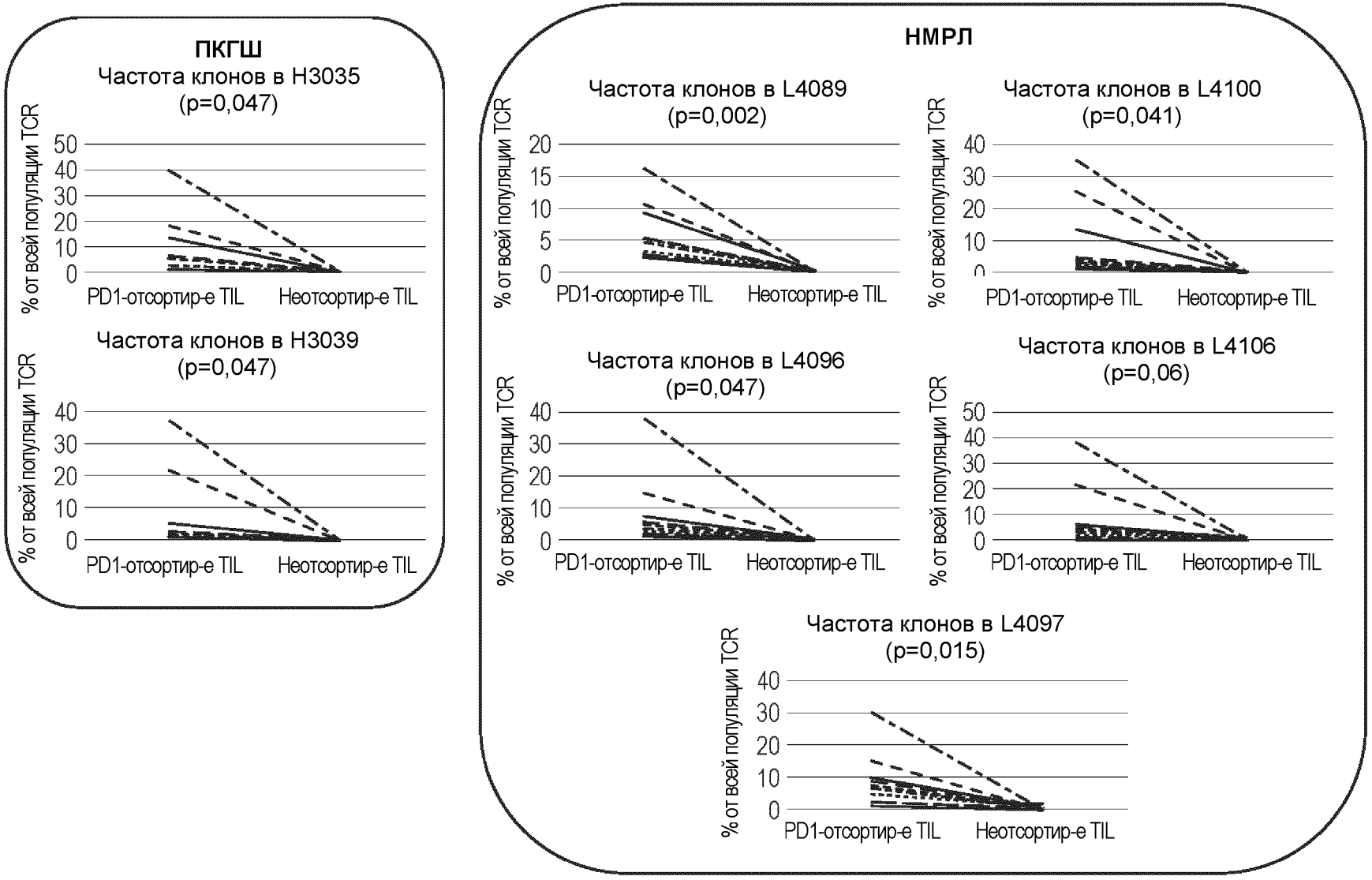
ФИГ. 167


100
80
60
40
20
0
%CD3
TEMRA
TSCM
TCM
TEM
PD1-отобранные TIL
Неотобранные TIL

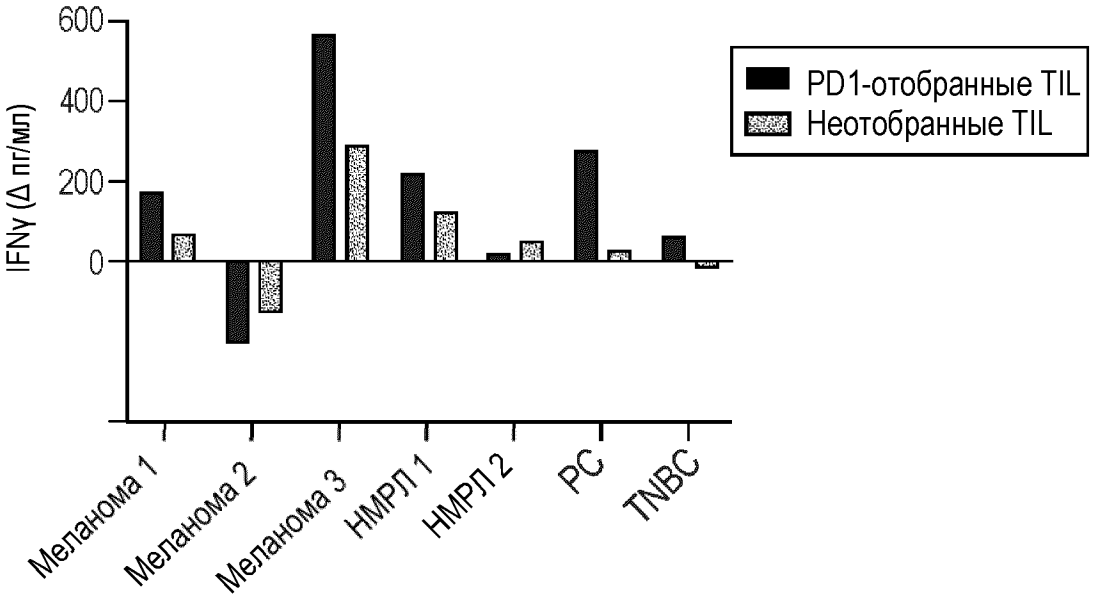
ФИГ. 168


****
100
80
60
40
20
0
% PD-1
****
***
PD1-отобранные TIL
Неотобранные TIL
До
После
Экспансия

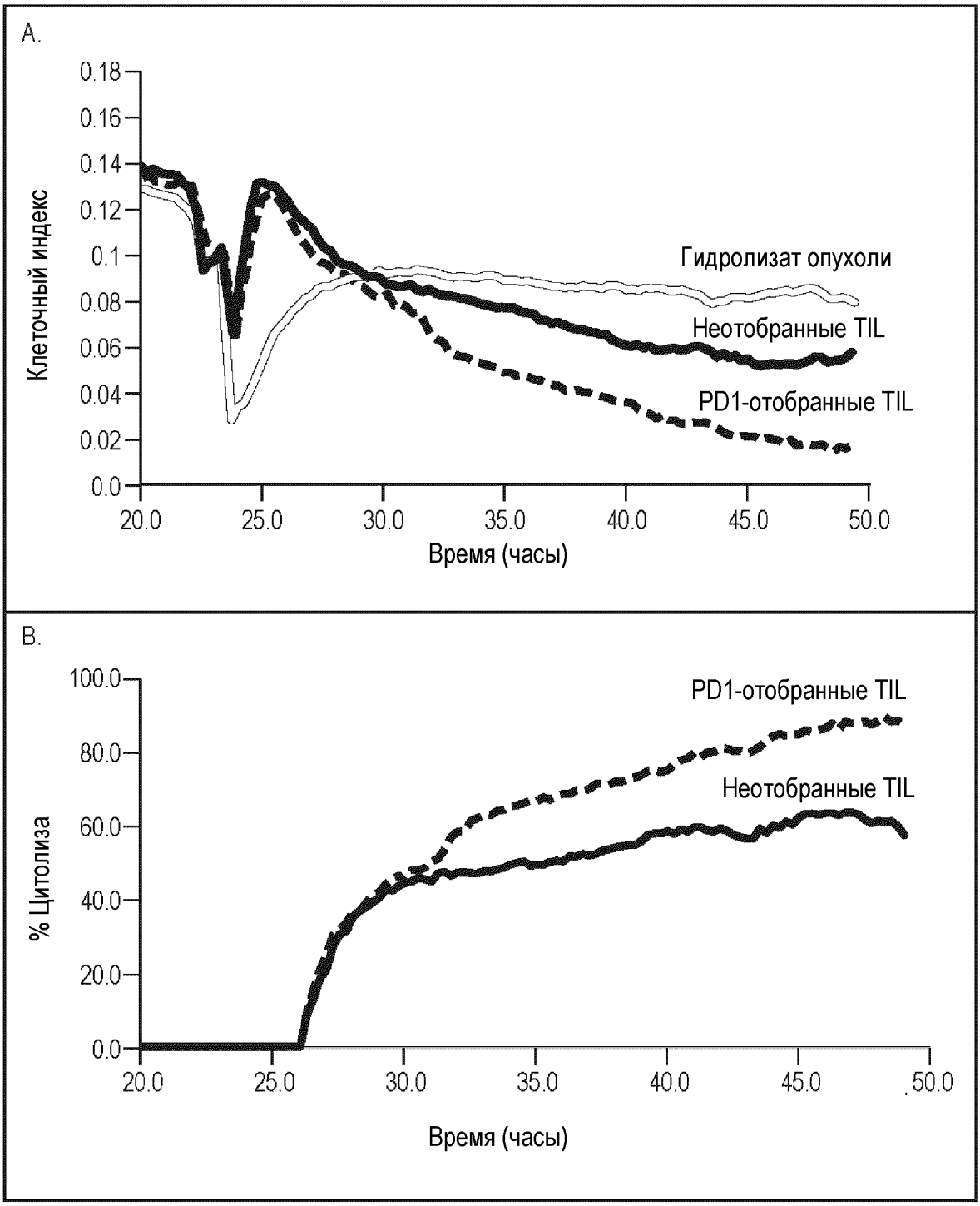
ФИГ. 169


ПКГШ
Частота клонов в H3035
(p=0,047)
% от всей популяции TCR
50
40
30
20
10
0
PD1-отсортир-е TIL
Неотсортир-е TIL
Частота клонов в H3039
(p=0,047)
% от всей популяции TCR
40
30
20
10
0
PD1-отсортир-е TIL
Неотсортир-е TIL
НМРЛ
Частота клонов в L4089
(p=0,002)
% от всей популяции TCR
20
15
10
5
0
PD1-отсортир-е TIL
Неотсортир-е TIL
Частота клонов в L4100
(p=0,041)
% от всей популяции TCR
40
30
20
10
0
PD1-отсортир-е TIL
Неотсортир-е TIL
Частота клонов в L4096
(p=0,047)
% от всей популяции TCR
40
30
20
10
0
PD1-отсортир-е TIL
Неотсортир-е TIL
Частота клонов в L4106
(p=0,06)
% от всей популяции TCR
50
40
30
20
10
0
PD1-отсортир-е TIL
Неотсортир-е TIL
Частота клонов в L4097
(p=0,015)
% от всей популяции TCR
40
30
20
10
0
PD1-отсортир-е TIL
Неотсортир-е TIL

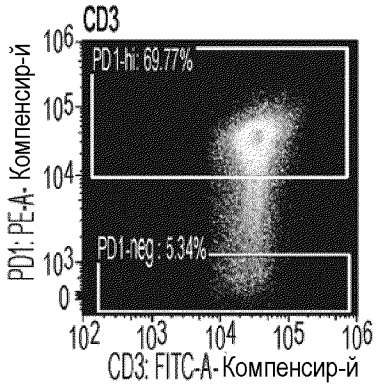
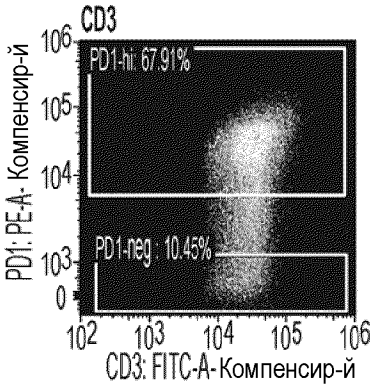
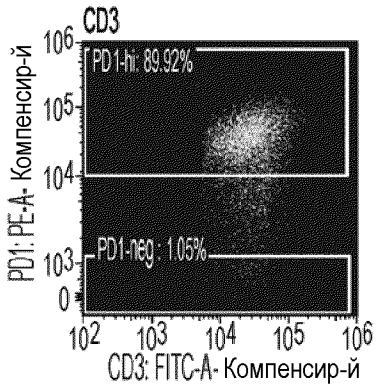
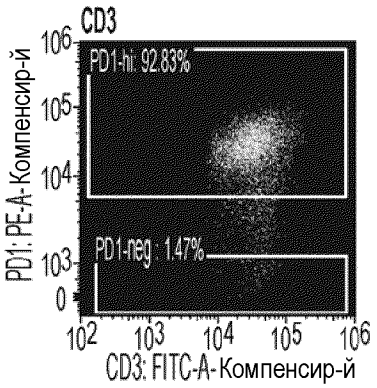
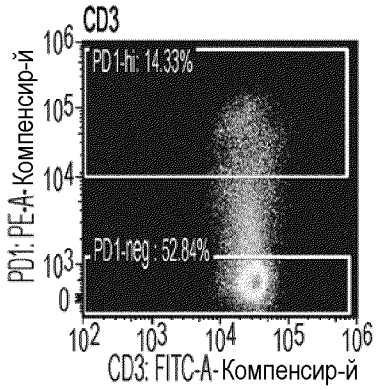
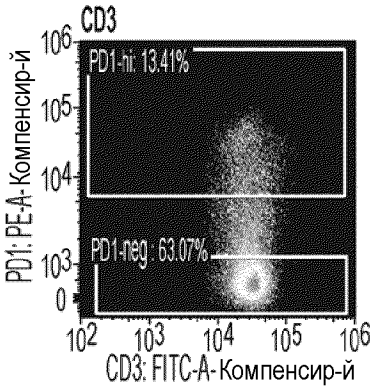
ФИГ. 170


600
400
200
0
IFNγ (Δ пг/мл)
PD1-отобранные TIL
Неотобранные TIL
Меланома 1
Меланома 2
Меланома 3
НМРЛ 1
НМРЛ 2
РС
TNBC

ФИГ. 171


A.
Клеточный индекс
0.18
0.16
0.14
0.12
0.1
0.08
0.06
0.04
0.02
0.0
20.0
25.0
30.0
35.0
40.0
45.0
50.0
Время (часы)
Гидролизат опухоли
Неотобранные TIL
PD1-отобранные TIL
B.
% Цитолиза
100.0
80.0
60.0
40.0
20.0
0.0
20.0
25.0
30.0
35.0
40.0
45.0
50.0
Время (часы)
PD1-отобранные TIL
Неотобранные TIL

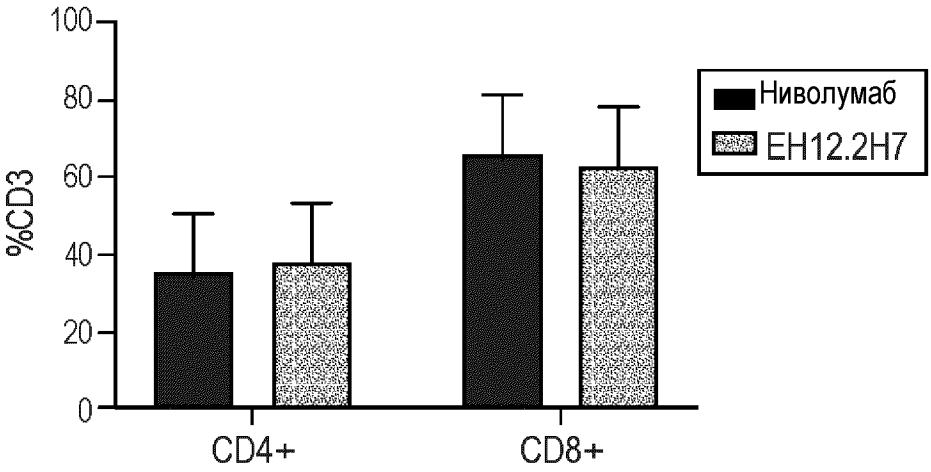
ФИГ. 172

	Ниволумаб	EH12.2H7
Яичника		
Меланома		
ПКГШ		

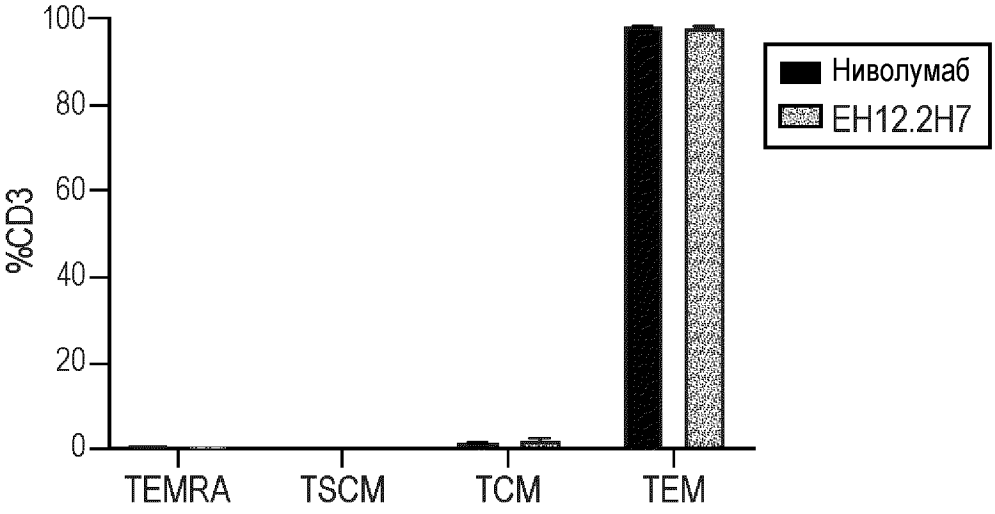
ФИГ. 172C

Гистология опухоли	Сортировка антителом к PD-1	% PD-1 (от CD3)	Чистота PD-1 после сортировки	Активация Кратность экспансии	REP Кратность экспансии	Общий выход жизнеспособных клеток (x 10^9)
Яичника *	Ниволумаб	79,66	98,98	2960	570	114,1
	EH12.2H7	69,91	97,89	4905	461	92,3
Меланома *	Ниволумаб	90,10	96,28	1975	434	86,8
	EH12.2H7	93,57	100,00	1427	559	84,1
ПКГШ **	Ниволумаб	14,61	95,34	1291	720	88,1
	EH12.2H7	14,60	96,36	1486	612	81,0

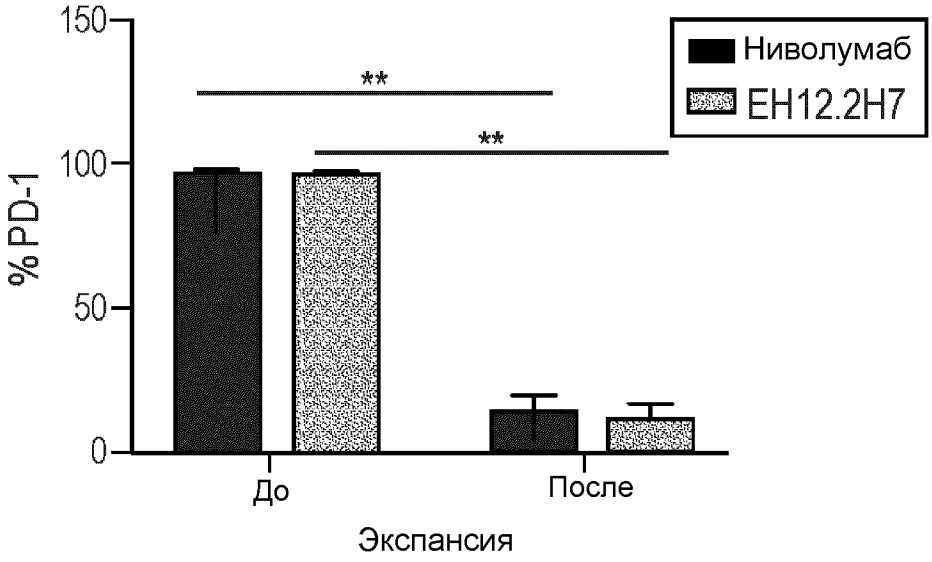
ФИГ. 173



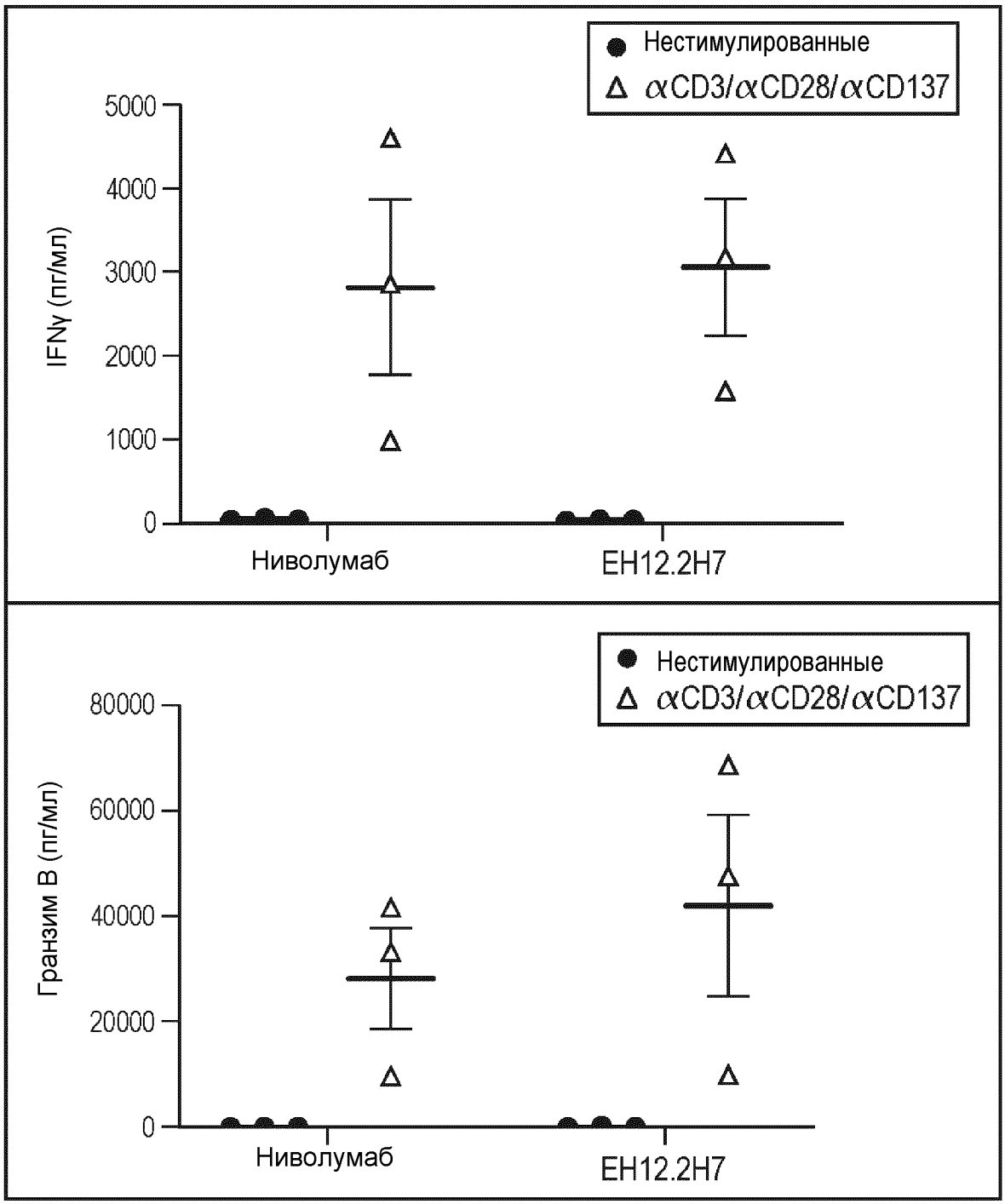
ФИГ. 174



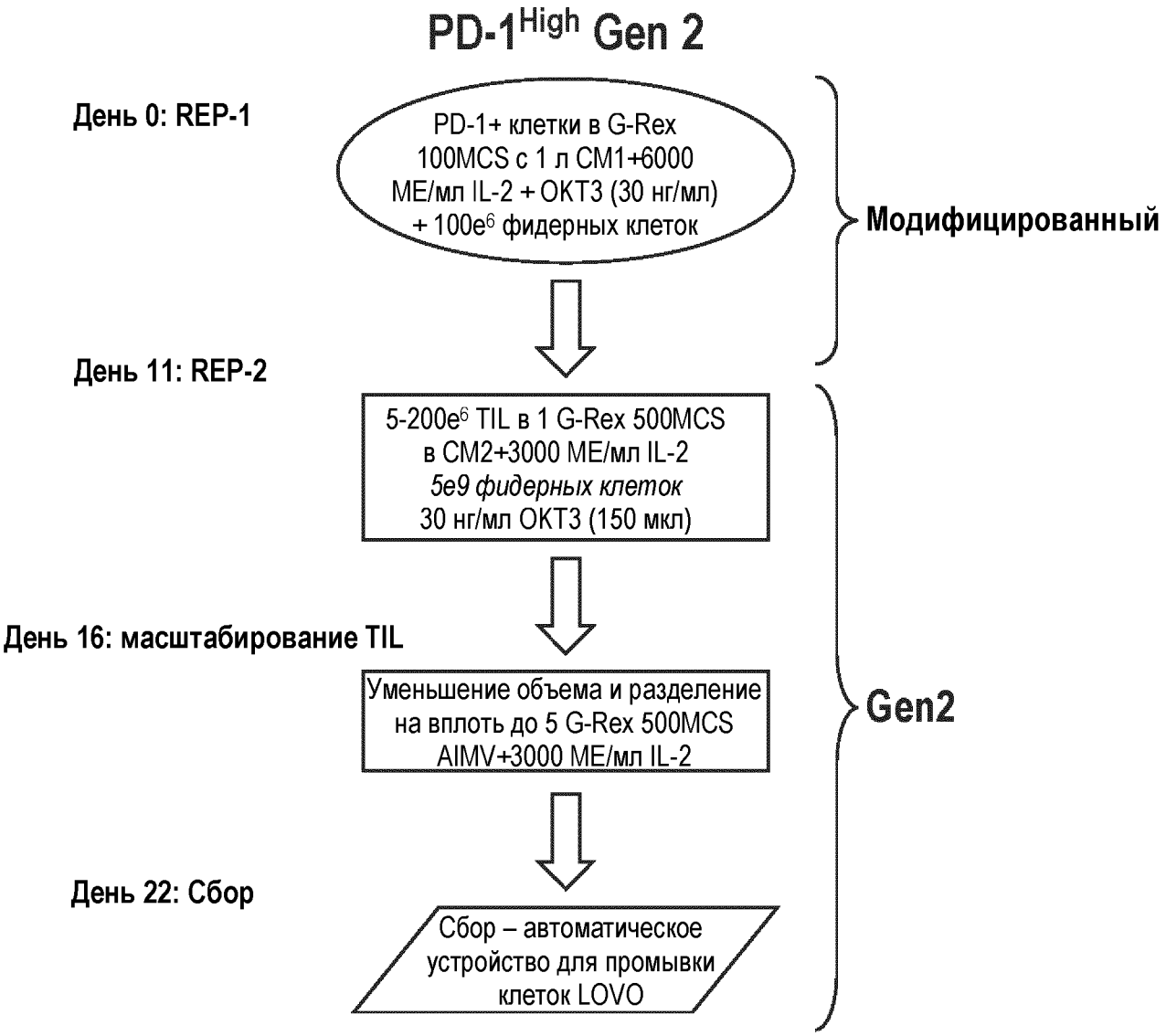
ФИГ. 175



ФИГ. 176

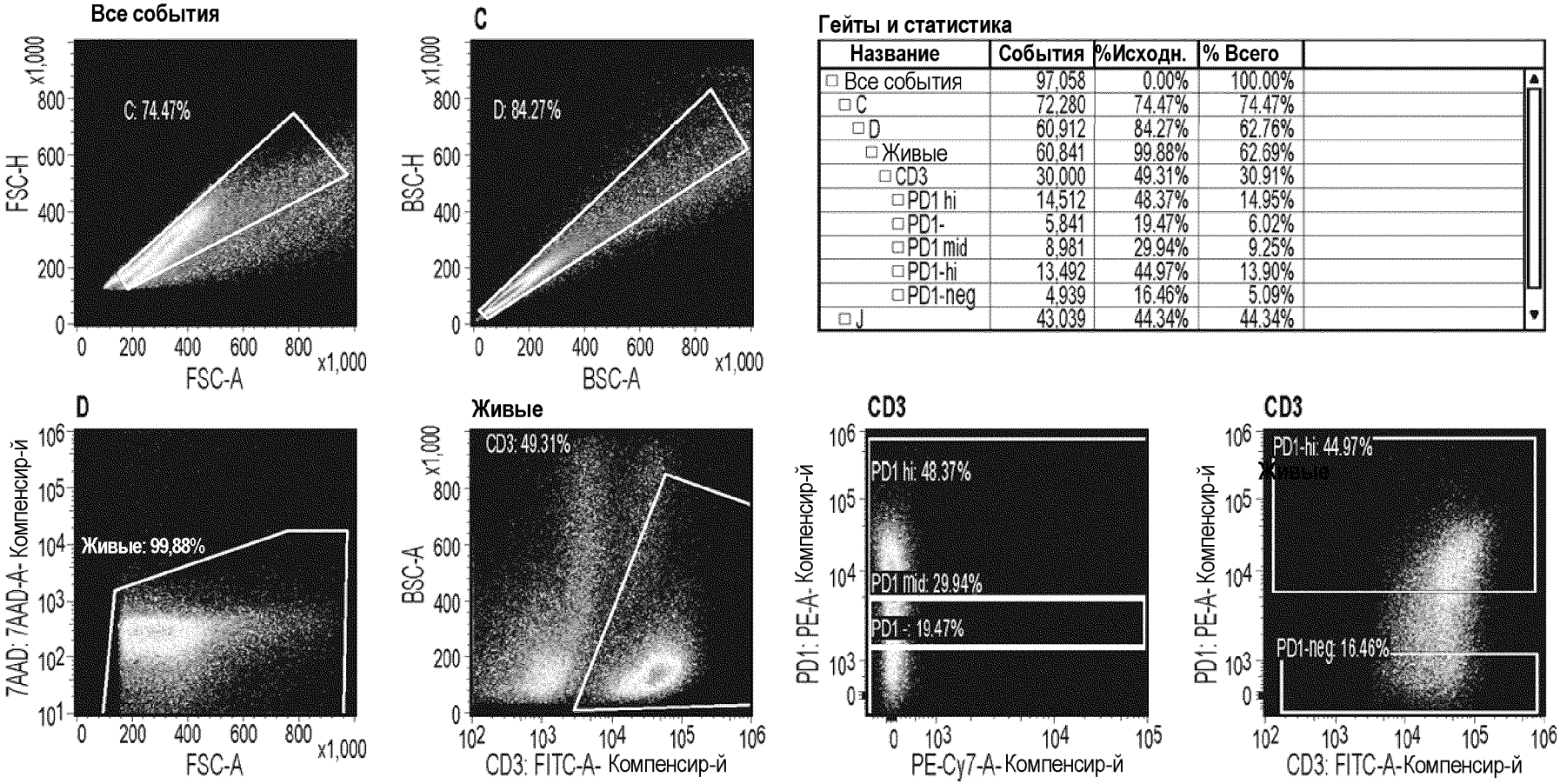

Нестимулированные
αCD3/αCD28/αCD137
IFNγ (пг/мл)
5000
4000
3000
2000
1000
0
Ниволумаб
EH12.2H7
Нестимулированные
αCD3/αCD28/αCD137
Гранзим B (пг/мл)
80000
60000
40000
20000
0
Ниволумаб
EH12.2H7

ФИГ. 177


PD-1High Gen 2
День 0: REP-1
PD-1+ клетки в G-Rex
100MCS с 1 л CM1+6000
ME/мл IL-2 + OKT3 (30 нг/мл)
+ 100e6 фидерных клеток
Модифицированный
День 11: REP-2
5-200e6 TIL в 1 G-Rex 500MCS
в CM2+3000 ME/мл IL-2
5e9 фидерных клеток
30 нг/мл OKT3 (150 мкл)
День 16: масштабирование TIL
Уменьшение объема и разделение
на вплоть до 5 G-Rex 500MCS
AIMV+3000 ME/мл IL-2
Gen2
День 22: Сбор
Сбор – автоматическое
устройство для промывки
клеток LOVO

ФИГ. 178

Рабочий лист



ФИГ. 179