

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202291724 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2022.08.29

(51) Int. Cl. C12N 5/0783 (2010.01)

(22) Дата подачи заявки
2020.12.18

(54) УСТРОЙСТВА И СПОСОБЫ ДЛЯ ВЫДЕЛЕНИЯ ИНФИЛЬТРИРУЮЩИХ ОПУХОЛЬ ЛИМФОЦИТОВ И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ

(31) 62/951,559; 62/982,470; 63/047,431

(72) Изобретатель:

(32) 2019.12.20; 2020.02.27; 2020.07.02

Гест Райан, Маккаффри Джоанн (GB)

(33) US

(74) Представитель:

(86) PCT/GB2020/053315

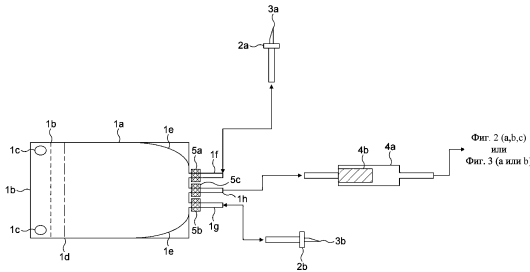
Джермакян Р.В., Угрюмов В.М.,
Прищепный С.В., Гизатуллина Е.М.,
Строкова О.В., Костюшенкова М.Ю.,
Гизатуллин Ш.Ф. (RU)

(87) WO 2021/123832 2021.06.24

(71) Заявитель:

ИНСТИЛ БАЙО (ЮКЕЙ) ЛИМИТЕД
(GB)

(57) Изобретение обеспечивает способы выделения и криоконсервации инфилттрирующих опухоль лимфоцитов (TIL) и получения терапевтических популяций TIL, включая способы с использованием набора и полуавтоматизированного устройства для асептической дезагрегации, обогащения и криоконсервации резецированной опухоли перед размножением популяции TIL. Настоящее изобретение также обеспечивает способы размножения и/или стабилизации TIL, например UTIL, композиции, включающие их, и способы лечения, включающие их.



202291724

A1

A1

202291724

УСТРОЙСТВА И СПОСОБЫ ДЛЯ ВЫДЕЛЕНИЯ ИНФИЛЬТРУЮЩИХ ОПУХОЛЬ ЛИМФОЦИТОВ И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ

Родственные заявки и включение путем ссылки

Настоящая заявка испрашивает приоритет по заявке на патент США с серийным номером 62/951559, поданной 20 декабря 2019 г., заявке на патент США с серийным номером 62/982470, поданной 27 февраля 2020 г., заявке на патент США с серийным номером 29/740293, поданной 2 июля 2020 г. и заявке на патент США с серийным номером 63/047,431, поданной 2 июля 2020 г., содержание которых полностью включено в настоящий документ посредством ссылки.

Делается ссылка на патентную заявку Соединенного Королевства, серийный номер GB1700621.4, поданную 13 января 2017 г., европейскую патентную заявку EP18701791.8, поданную 12 января 2018 г., международную патентную заявку, серийный номер PCT/GB2018/050088, поданную 12 января 2018 г., опубликованную как публикация PCT WO 2018/130845 от 19 июля 2018 г., публикацию европейского патента: EP3568459 и заявку на патент США с серийным номером 62/951559, поданную 20 декабря 2019 г., которые настоящим включены в качестве ссылок.

Делается ссылка на патентную заявку Соединенного Королевства, серийный номер GB1902763.0, поданную 1 марта 2019 г., патентную заявку Соединенного Королевства, серийный номер GB1904249.8, поданную 27 марта 2019 г., и международную патентную заявку, серийный номер PCT/EP2020/000053, поданную 28 февраля 2020 г., опубликованную как WO 2020/177920 10 сентября 2020 г.

Вышеприведенные заявки, Biomarker Predictive of Tumour Infiltrating Lymphocyte Therapy and the Uses Thereof, WO2019145711A1 PCT/GB2019/050188, Tumor Infiltrating Lymphocyte Therapy and Uses Thereof USA, PCT/GB2020/051790 и заявка США с серийным номером 62/878001, Receptors Providing Targeted Costimulation for Adoptive Cell Therapy WO 2020/152451, заявка США с серийным номером 62/951770 и GB1900858.0, Cells Expressing Recombinant Growth Factor Receptors WO 2017/103596A1, заявка США с серийным номером 16/061435, и публикация европейского патента EP3390436, и Chimeric Growth Factor Receptors WO2019243835A1 PCT/GB2019/051745, а также все документы, цитируемые в них или во время их рассмотрения («цитируемые в заявке документы»), и все документы, цитируемые или упоминаемые в цитируемых в заявке документах, и все документы, цитируемые или упоминаемые в настоящем документе («цитируемые в настоящем документе документы»), и все документы, цитируемые или упоминаемые в

цитируемых в настоящем документе документах, вместе с любыми инструкциями производителя, описаниями, спецификациями продуктов и таблицами продуктов для любых продуктов, упомянутых в настоящем документе или в любом документе, включенном в настоящий документ посредством ссылки, включены в настоящий документ посредством ссылки и могут быть использованы при осуществлении изобретения на практике. Более конкретно, все ссылочные документы включены посредством ссылки в той же степени, как если бы каждый отдельный документ был специально и индивидуально указан как включенный посредством ссылки.

Область техники, к которой относится изобретение

В настоящем изобретении обеспечены способы и устройства для выделения и замораживания инфильтрирующих опухоль лимфоцитов (TIL) из резецированной опухоли посредством полуавтоматизированной асептической обработки ткани опухоли и, таким образом, получения терапевтических популяций TIL.

Предпосылки создания изобретения

T-клетки происходят из гемопоэтических стволовых клеток, которые находятся в костном мозге, но впоследствии мигрируют в тимус и созревают в нем. Во время процесса созревания T-клетки подвергаются сериям событий отбора, тем самым генерируя разнообразный репертуар T-клеток. Эти клетки затем высвобождаются в периферический кровоток для выполнения своих специфических функций в составе адаптивной иммунной системы.

T-клетки не являются гомогенной группой клеток, а состоят из многих линий, среди которых преобладающие типы определяются экспрессией двух дополнительных клеточных маркеров. T-клетки, экспрессирующие CD4, обычно называют хелперами (Th), и считается, что они управляют многими функциями иммунной системы посредством межклеточного контакта и продукции молекул-медиаторов, называемых цитокинами. T-клетки CD8 считаются цитотоксическими (Tc) и считаются клетками, которые осуществляют непосредственное уничтожение клеток-мишеней. Все эти активности контролируются посредством взаимодействия T-клеточный рецептор/антиген/МНС – следовательно, при успешном распознавании пептид/МНС на клетке-мишени, клетки CD4 и CD8 действуют совместно посредством продукции цитокинов и цитотоксической активности для устранения клеток-мишеней, включая инфицированных вирусом и опухолевых клеток.

T-клетки не распознают интактные белки (антигены), но реагируют на короткие белковые фрагменты, представленные на поверхности клеток-мишеней

специфическими белками, называемыми главным комплексом гистосовместимости (МНС). В процессе созревания Т-клетки экспрессируют на своей клеточной поверхности антигенспецифический Т-клеточный рецептор (TCR), который распознает эти короткие белковые (пептидные) антигены, представленные молекулами МНС. Следовательно, только когда правильный пептид представлен на поверхности клетки-мишени, связанной с правильной молекулой МНС, Т-клетка активирует свои иммунные функции. Таким образом, частота опухолеспецифических Т-клеток в опухоли выше, что делает ее идеальным источником опухолеспецифических Т-клеток, т.е. опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов (ТИЛ) (Andersen et al., *Cancer Res.* 2012 Apr 1;72(7):1642-50. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-11-2614. Epub 2012 Feb 6).

Конечно, это очень упрощенный взгляд и представляет краткий общий обзор функции Т-клеток. Адаптивный иммунный ответ не действует изолированно, а требует обширного взаимодействия с целым рядом иммунных и неиммунных клеток, чтобы способствовать эффективной доставке Т-клеток к требуемому участку активности, чтобы гарантировать, что инициируется правильный иммунный ответ и что иммунный ответ контролируется и отключается, когда это необходимо. Следовательно, даже у пациентов, у которых изготовленные ТИЛ инициируют иммунный ответ на опухоль, он может затем поддерживаться или подавляться собственной иммунной системой пациента и опухолевым окружением.

Опухолеспецифические ТИЛ представляют собой Т-клетки, выделенные из опухоли пациента с метастатическим раком. У большинства онкологических пациентов циркулирующие опухолеспецифические Т-клетки практически не обнаруживаются в крови. Однако некоторые виды рака, такие как меланома кожи, по-видимому, являются иммуногенными, поскольку они обладают способностью индуцировать значительное количество Т-клеток с противоопухолевой активностью во время естественного течения роста опухоли, особенно в пределах участков опухоли (Muul et al., *J Immunol.* 1987 Feb 1;138(3):989-95). Опухолереактивные Т-клетки, «отобранные как Т-клетки, специфические для опухоли», могут быть выделены из опухолевого материала и размножены *ex vivo* в больших количествах. Отчеты показали, что эти клетки обладают противоопухолевой реактивностью, которая при реинфузии пациенту может привести к разрушению опухоли и клиническим ответам (Dudley et al., *Science.* 2002 Oct 25;298(5594):850-4. Epub 2002 Sep 19). В последующих испытаниях была подтверждена важность характеристик Т-клеток и подтверждено преимущество «молодых» быстрорастущих клеток «молодых ТИЛ», при этом клетки «не отбираются по

специфичности» вообще. Примечательно, что это дает отличные показатели ответа в ТИЛ или CD8 отобранных ТИЛ, составляющего около 50% (Besser et al., *Anticancer Res.* 2009 Jan;29(1):145-54; Dudley et al., *Clin Cancer Res.* 2010 Dec 15;16(24):6122-31. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-10-1297. Epub 2010 Jul 28).

В исследованиях, проведенных Andersen et al. (*Cancer Res.* 2012 Apr 1;72(7):1642-50. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-11-2614. Epub 2012 Feb 6), было выявлено, что специфические для меланомы Т-клетки (для известных раковых антигенов) обогащены внутри опухоли по сравнению с Т-клетками в периферической крови. Это подтверждает догму о том, что выделенная популяция ТИЛ обогащена опухолеспецифическими Т-клетками, что приводит к повышенной противоопухолевой активности по сравнению с ранними испытаниями у пациентов с меланомой с использованием Т-клеток, выделенных из периферической крови и размноженных на аналогичных уровнях ИЛ-2 или только внутривенного ИЛ-2 (клетки LAK – Bordignon et al., *Haematologica.* 1999 Dec;84(12):1110-49).

Патент США 10398734 относится к способам размножения ТИЛ и получения терапевтических популяций ТИЛ. Опухоль по патенту '734 отгружается в виде объемной опухоли, и ТИЛ внутри объемной опухоли быстро становятся дефицитными по кислороду и постепенно ухудшаются с течением времени. Опухоль по патенту '734 также обрабатывают до фрагментов, которые имеют ухудшенные внутренние клеточные популяции. Кроме того, ТИЛ, используемые для изготовления, будут только ТИЛ, размноженными из фрагментов ткани, а не любыми ТИЛ, оставшимися внутри. Следовательно, полученная клеточная популяция может не отражать всего разнообразия опухолевого окружения.

Сбор ТИЛ требует асептической дезагрегации солидной ткани в виде объемной опухоли перед культивированием и размножением популяции ТИЛ. Условия во время дезагрегации солидных тканей и время, необходимое для сбора клеток, оказывают существенное влияние на жизнеспособность и восстановление конечного изолированного материала. Клеточная суспензия, полученная из солидной ткани, которую получают с использованием обычных способов, часто включает широкий спектр различных типов клеток, среду для дезагрегации, остатки ткани и/или жидкости. Это может потребовать использования селективного нацеливания и/или выделения типов клеток, например, перед изготовлением регенеративных лекарственных средств, адоптивными клеточными терапиями, АТМР, диагностическими исследованиями *in vitro* и/или научными исследованиями.

В настоящее время в методах отбора или обогащения обычно используется один из следующих параметров: размер, форма, плотность, адгезия, сильные белок-белковые взаимодействия (т.е. взаимодействия антитело-антиген). Например, в некоторых случаях отбор может быть проведен путем обеспечения среды, поддерживающей рост, и путем контроля условий культивирования или более сложных взаимодействий клеточных маркеров, ассоциированных с полупостоянным или постоянным взаимодействием с магнитными или немагнитными твердофазными или полутвердофазными субстратами.

Для обогащения, выделения или селекции может быть использована любая технология сортировки, например, аффинная хроматография или любая другая методика антителозависимого разделения, известная в данной области. Любая методика лиганд-зависимого разделения, известная в данной области, может быть использована в сочетании с методиками как позитивного, так и негативного разделения, основанными на физических свойствах клеток. Особенно мощной технологией сортировки является магнитная сортировка клеток. Способ магнитного разделения клеток коммерчески доступны, например, от Thermo Fisher, Miltenyi Biotec, Stemcell Technologies, Cellpro Seattle, Advanced Magnetics, Boston Scientific или Quad Technologies. Например, моноклональные антитела могут быть напрямую связаны с магнитными полистирольными частицами, такими как Dynal M 450 или подобными магнитными частицами, и использованы, например, для разделения клеток. Технология Dynabeads не основана на применении колонки, вместо этого эти магнитные шарики с прикрепленными клетками обладают кинетикой жидкой фазы в пробирке для образцов, и клетки выделяют путем помещения пробирки на магнитную подставку.

Обогащение, сортировка и/или обнаружение клеток в образце включает использование моноклональных антител в сочетании с коллоидными суперпарамагнитными микрочастицами, имеющими органическое покрытие, например, из полисахаридов (например, технология магнитно-активированной сортировки клеток (MACS) (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany)). Частицы (например, нанополлимеры или MicroBeads) могут быть либо напрямую конъюгированы с моноклональными антителами, либо использоваться в комбинации с анти-иммуноглобулин-, авидин- или антигаптен-специфическими MicroBeads, либо покрыты другими молекулами млекопитающих с селективными связывающими свойствами.

Технологии селекции с помощью магнитных частиц, такие как описанные выше, обеспечивают возможность позитивного или негативного разделения клеток путем их инкубации с магнитными наночастицами, покрытыми антителами или другими фрагментами, направленными против конкретного поверхностного маркера. Это заставляет клетки, экспрессирующие этот маркер, прикрепляться к магнитным наночастицам. После этого клеточный раствор помещают в твердом или гибком контейнере в сильное магнитное поле. На этом этапе клетки прикрепляются к наночастицам (экспрессирующим маркер) и остаются на колонке, в то время как другие клетки (не экспрессирующие маркер) проходят через нее. С помощью этого способа клетки могут быть разделены позитивно или негативно по отношению к конкретному маркеру(ам).

В случае положительного отбора клетки, экспрессирующие представляющий интерес маркер(ы), которые прикреплены к магнитной колонке, вымывают в отдельный сосуд после удаления колонки из магнитного поля.

В случае негативного отбора используемое антитело или селективный фрагмент направлен против поверхностного маркера(ов), который, как известно, присутствует на клетках, не представляющих интерес. После нанесения раствора клеток/магнитных наночастиц на колонку клетки, экспрессирующие эти антигены, связываются с колонкой, и проходящая через нее фракция собирается, так как она не содержит представляющие интерес клетки. Поскольку эти клетки не помечены селективными антителами или фрагментом(ами), связанным с наночастицами, они остаются «нетронутыми». Известные стадии ручной или полуавтоматизированной обработки солидной ткани являются трудоемкими и требуют знаний в данной области.

Кроме того, при использовании материала в терапевтических целях, во время работы с клеточными культурами обработка требует строгих регламентированных условий окружающей среды, например, обработка ткани в ходе или до дезагрегации, ферментативного расщепления и переноса в устройства для хранения, или условий инкубации для дезагрегации/целлюляризации и получения жизнеспособных тканей. Как правило, для этого процесса потребуется множество единиц лабораторного оборудования и оборудования для обработки тканей, а также персонал, обладающий навыками и знаниями в научной области для работы в критический период, содержащимися в асептической среде(ах) сдерживающих опасность, или в помещении(ях) для обработки тканей, чтобы безопасно выполнять одни и те же действия, а также свести к минимуму риск загрязнения.

На жизнеспособность и извлечение желаемого продукта из ткани могут влиять условия, присутствующие во время сбора ткани, дезагрегации и сбора клеток. Изобретение возникло из-за необходимости обеспечить улучшенную обработку ткани, включая устройство/прибор, выполняющий указанную обработку, удовлетворяя потребность, описанную выше.

Цитирование или идентификация любого документа в данной заявке не является признанием того, что такой документ доступен в качестве предшествующего уровня техники для настоящего изобретения.

Краткое описание изобретения

Настоящее изобретение относится к способу выделения терапевтической популяции инфильтрирующих опухоль лимфоцитов (ТИЛ), который может включать:

- (a) резекцию опухоли у субъекта;
- (b) хранение резецированной опухоли в одноразовом асептическом наборе, при этом асептический набор содержит:

модуль дезагрегации для приема и обработки материала, содержащего солидную ткань млекопитающих;

дополнительный модуль обогащения для фильтрации дезагрегированного материала солидной ткани и сегрегации недезагрегированной ткани и фильтрата; и

модуль стабилизации для необязательной дальнейшей обработки и/или хранения дезагрегированного материала продукта,

при этом каждый из модулей содержит один или несколько гибких контейнеров, соединенных одним или несколькими трубками, приспособленными для протекания тканевого материала между ними; и

при этом каждый из модулей содержит один или несколько впускных отверстий для обеспечения возможности асептического ввода среды и/или реагентов в один или несколько гибких контейнеров;

(c) асептическую дезагрегацию резецированной опухоли в модуле дезагрегации с получением дезагрегированной опухоли;

(d) выполнение первого размножения путем культивирования дезагрегированной опухоли в среде для культивирования клеток, содержащей ИЛ-2, с получением первой популяции УТИЛ;

(e) выполнение второго размножения путем культивирования первой популяции UTIL с дополнительными ПЛ-2, ОКТ-3 и антигенпрезентирующими клетками (APC) с получением второй популяции ТП;

(f) сбор и/или криоконсервация второй популяции UTIL. В некоторых вариантах осуществления стадия а) является необязательной.

Настоящее изобретение относится к способу выделения терапевтической популяции криоконсервированных инфильтрирующих опухоль лимфоцитов (ТИЛ), который может включать:

(a) резекцию опухоли у субъекта;

(b) хранение резецированной опухоли в одноразовом асептическом наборе, при этом асептический набор содержит:

модуль дезагрегации для приема и обработки материала, содержащего солидную ткань млекопитающих;

дополнительный модуль обогащения для фильтрации дезагрегированного материала солидной ткани и сегрегации недеагрегированной ткани и фильтрата; и

модуль стабилизации для необязательной дальнейшей обработки и/или хранения дезагрегированного материала продукта,

при этом каждый из модулей содержит один или несколько гибких контейнеров, соединенных одним или несколькими трубками, выполненными с возможностью протекания тканевого материала между ними; и

при этом каждый из модулей содержит один или несколько впускных отверстий для обеспечения возможности асептического ввода среды и/или реагентов в один или несколько гибких контейнеров;

(c) асептическую дезагрегацию резецированной опухоли в модуле дезагрегации с получением дезагрегированной опухоли, при этом резецированная опухоль является дезагрегированной в достаточной степени, если ее можно криоконсервировать с минимальным повреждением клеток;

(d) криоконсервацию дезагрегированной опухоли в модуле стабилизации;

(e) выполнение первого размножения путем культивирования дезагрегированной опухоли в среде для культивирования клеток, содержащей ПЛ-2, с получением первой популяции UTIL;

(f) выполнение второго размножения путем культивирования первой популяции UTIL с дополнительным количеством ПЛ-2, ОКТ-3, и антигенпрезентирующими клетками (APC) с получением второй популяции ТП;

(g) сбор и/или криоконсервацию второй популяции UTP. В некоторых вариантах осуществления стадия а) является необязательной.

Дезагрегация может включать физическую дезагрегацию, ферментативную дезагрегацию или физическую и ферментативную дезагрегацию. В предпочтительном варианте осуществления дезагрегированная опухоль является целлюляризованной или очищенной.

В настоящем изобретении наборы контейнеров, которые соединены между собой и имеют определенные отдельные функции, поддерживают асептически закрытую систему для обработки, необязательно обогащают, но стабилизируют дезагрегированную и целлюляризованную опухоль. По существу, изобретение обеспечивает быстро предварительно стерилизованную среду для сведения к минимуму требуемого времени и риска загрязнения или воздействия на оператора во время обработки резецированной опухоли.

Асептический набор позволяет проводить закрытую обработку солидных тканей, устраняя риск загрязнения конечного целлюляризованного продукта по сравнению со стандартной незакрытой обработкой тканей, особенно когда процесс обработки выполняется в месте извлечения/заготовки тканей и требует хранения до окончательной обработки клеток для их окончательного применения. Кроме того, повышается безопасность для оператора за счет сокращения прямого контакта с биологически опасным материалом, который может содержать инфекционные организмы, такие как вирусы. Набор также позволяет стабилизировать весь или часть окончательно обработанного целлюляризованного материала для транспортировки или хранения перед обработкой для его окончательного использования.

Изобретение позволит обрабатывать резецированную опухоль во время резекции или позднее, если это необходимо, не влияя на процедуру извлечения или жизнеспособность целлюляризованной опухоли.

В некоторых вариантах осуществления может быть использовано необязательное обогащение в форме физической очистки для уменьшения количества примесей, таких как реагенты, которые больше не требуются; клеточный дебрис; незагрегированные опухолевые ткани и жиры. Для этой цели асептический набор может иметь дополнительный модуль обогащения перед стабилизацией. Отдельные клетки или агрегаты из небольшого количества клеток могут быть обогащены для стабилизации после дезагрегации путем исключения частиц и жидкостей размером менее 5 мкм или не полностью дезагрегированного материала размером примерно 200

мкм или больше, но это будет различаться в зависимости от ткани и эффективности дезагрегации, и могут быть использованы различные варианты осуществления в виде тканеспецифических наборов в зависимости от ткани или конечного применения дезагрегированной опухоли.

В другом варианте осуществления после стадии (с) получают суспензию отдельных клеток.

В другом варианте осуществления первая популяция UTIL требует примерно 1-20 миллионов UTIL.

В другом варианте осуществления стадия (е) может дополнительно включать рост UTIL из исходного материала резецированной опухоли с последующим быстрым размножением на стадии (f).

В другом варианте осуществления стадия (е) может выполняться в течение примерно двух недель, и стадия (f) может выполняться в течение примерно двух недель.

В другом варианте осуществления дополнительная стадия (h) включает суспендирование второй популяции UTIL. Суспендирование может быть выполнено в забуференном физиологическом растворе, человеческом сывороточном альбумине и/или диметилсульфоксиде (DMSO).

Настоящее изобретение также может включать терапевтическую популяцию криоконсервированных UTIL, полученных с помощью любого из раскрытых в настоящем документе способов. Терапевтическая популяция может содержать примерно от 5×10^9 до 5×10^{10} Т-клеток.

Настоящее изобретение также относится к криоконсервированному пакету раскрытой в настоящем документе терапевтической популяции. Криоконсервированный пакет может быть использован для внутривенного вливания.

Настоящее изобретение также охватывает способ лечения рака, который может включать введение раскрытой в настоящем документе терапевтической популяции или раскрытого в настоящем документе криоконсервированного пакета. Настоящее изобретение также охватывает раскрытую в настоящем документе терапевтическую популяцию, фармацевтическую композицию или криоконсервированный пакет для применения в лечении рака. Рак может представлять собой рак мочевого пузыря, рак молочной железы, рак, вызванный вирусом папилломы человека, рак шейки матки, рак головы и шеи (включая плоскоклеточный рак головы и шеи (HNSCC), рак легких,

меланому, рак яичников, немелкоклеточный рак легкого (NSCLC), рак почки или почечно-клеточную карциному.

В другом варианте осуществления один или несколько гибких контейнеров асептического набора содержат упругий деформируемый материал.

В другом варианте осуществления один или несколько гибких контейнеров модуля дезагрегации асептического набора содержат одно или несколько герметично закрываемых отверстий. Один или несколько гибких контейнеров модуля дезагрегации и/или модуля стабилизации также могут содержать термосвариваемый сварной шов.

В другом варианте осуществления один или несколько гибких контейнеров асептического набора имеют закругленные внутрь края.

В другом варианте осуществления один или несколько гибких контейнеров модуля дезагрегации асептического набора содержат поверхности дезагрегации, приспособленные для механического измельчения и разрушения находящейся в них солидной опухоли.

В другом варианте осуществления один или несколько гибких контейнеров модуля обогащения асептического набора содержат фильтр, который удерживает ретентат целлюляризованной дезагрегированной солидной опухоли.

В другом варианте осуществления один или несколько гибких контейнеров модуля стабилизации асептического набора содержат среду с составом для хранения жизнеспособных клеток в растворе или в криоконсервированном состоянии.

В другом варианте осуществления асептический набор дополнительно содержит цифровую, электронную или электромагнитную идентификационную метку. Идентификатор метки может относиться к конкретной программе, которая определяет тип процесса дезагрегации и/или обогащения, и/или стабилизации, один или несколько типов сред, используемых в указанных процессах, включая необязательный раствор для замораживания, подходящий для замораживания с регулируемой скоростью.

В другом варианте осуществления один и тот же гибкий контейнер может образовывать часть одного или нескольких модулей дезагрегации, модуля стабилизации и необязательных модулей обогащения.

В другом варианте осуществления модуль дезагрегации асептического набора содержит первый гибкий контейнер для приема ткани, подлежащей обработке.

В другом варианте осуществления модуль дезагрегации асептического набора содержит второй гибкий контейнер, содержащий среду для дезагрегации.

В другом варианте осуществления необязательный модуль обогащения асептического набора содержит первый гибкий контейнер и третий гибкий контейнер для приема обогащенного фильтрата.

В другом варианте осуществления модуль дезагрегации и модуль стабилизации асептического набора содержат второй гибкий контейнер, и второй гибкий контейнер содержит среду для ферментативного расщепления и среду для стабилизации.

В другом варианте осуществления модуль стабилизации асептического набора содержит четвертый гибкий контейнер, содержащий стабилизирующую среду.

В другом варианте осуществления модуль стабилизации асептического набора также содержит первый гибкий контейнер и/или третий гибкий контейнер для хранения и/или криоконсервации.

Настоящее изобретение также обеспечивает способ выделения терапевтической популяции криоконсервированных УТЦ, включающий:

- (a) резекцию опухоли у субъекта;
- (b) хранение резецированной опухоли в одноразовом асептическом наборе,

при этом асептический набор содержит:

модуль дезагрегации для приема и обработки материала, содержащего солидную ткань млекопитающих;

необязательный модуль обогащения для фильтрации дезагрегированного материала солидной ткани и сегрегации недезагрегированной ткани и фильтрата; и

модуль стабилизации для необязательной дальнейшей обработки и/или хранения дезагрегированного материала продукта,

при этом каждый из модулей содержит один или несколько гибких контейнеров, соединенных одним или несколькими трубками, выполненными с возможностью протекания тканевого материала между ними; и

при этом каждый из модулей содержит одно или несколько впускных отверстий для обеспечения возможности асептического ввода среды и/или реагентов в один или несколько гибких контейнеров;

(c) асептическую дезагрегацию резецированной опухоли в модуле дезагрегации с получением дезагрегированной опухоли, при этом резецированная опухоль является достаточно дезагрегированной, если она может быть криоконсервирована без повреждения клеток;

- (d) криоконсервацию дезагрегированной опухоли в модуле стабилизации;

(e) выполнение первого размножения путем культивирования дезагрегированной опухоли в среде для культивирования клеток, содержащей П-2, с получением первой популяции УТІЛ;

(f) осуществление второго размножения путем культивирования первой популяции УТІЛ с дополнительными П-2, ОКТ-3 и антигенпрезентирующими клетками (АРС) с получением второй популяции ТП;

(g) сбор и/или криоконсервацию второй популяции УТІЛ. В некоторых вариантах осуществления стадия а) является необязательной.

В другом варианте осуществления автоматизированное устройство дополнительно содержит считыватель меток радиочастотной идентификации для распознавания асептического набора, чтобы его можно было сканировать и распознавать во время автоматизированной обработки, например, внутри автоматизированного устройства в вариантах осуществления настоящего изобретения. Важно отметить, что метка предоставляет информацию об условиях и шагах, необходимых автоматически обработать, поэтому просто путем сканирования набора любая автоматизированная система, используемая с набором для обработки ткани, может быть использована без дополнительного вмешательства или загрязнения. После помещения образца ткани в модуль дезагрегации его можно, например, запечатать вручную или автоматически перед началом обработки.

Программируемый процессор автоматизированного устройства также может распознавать асептический набор по метке и впоследствии может исполнять программу набора, определяющую тип процессов дезагрегации, обогащения и стабилизации, а также соответствующие типы сред, необходимые для указанных процессов, которые включают необязательный раствор для замораживания, подходящий для замораживания с регулируемой скоростью. Программируемый процессор автоматизированного устройства может быть адаптирован для связи и управления модулем дезагрегации, модулем обогащения и/или модулем стабилизации. Иными словами, набор, таким образом, считывается автоматизированным устройством, используемым для исполнения определенного, полностью автоматизированного способа обработки опухоли при введении в такое устройство.

Программируемый процессор автоматизированного устройства может управлять модулем дезагрегации, чтобы обеспечить физическое и/или биологическое разрушение материала солидной ткани. Это разрушение может представлять собой физическое или ферментативное разрушение материала солидной ткани.

Ферментативное разрушение материала солидной ткани может осуществляться одним или несколькими ферментными растворами среды, выбранными из группы, состоящей из коллагеназы, трипсина, липазы, гиалуронидазы, дезоксирибонуклеазы, либеразы НІ, пепсина и их смесей.

В другом варианте осуществления программируемый процессор управляет поверхностями дезагрегации внутри гибких контейнеров для дезагрегации, которые механически раздавливают и разрезают солидную ткань. В некоторых вариантах осуществления поверхности дезагрегации контролируются механическими поршнями.

В другом варианте осуществления программируемый процессор управляет модулем стабилизации для криоконсервации обогащенной дезагрегированной солидной ткани в контейнере. Это может быть достигнуто с помощью программируемой настройки температуры, условие, которое определяется путем считывания метки набора, вставленного в устройство.

В другом варианте осуществления для выполнения различных функций процесса обеспечены один или несколько дополнительных компонентов устройства и/или набора, которые могут быть доступны в любой комбинации. Это может включать: датчики, способные распознавать завершение процесса дезагрегации в модуле дезагрегации перед переносом дезагрегированной солидной ткани в необязательный модуль обогащения; датчики веса для определения количества среды, необходимой в контейнерах одного или нескольких из модуля дезагрегации; модуля обогащения; и/или модуля стабилизации и управления переносом материала между соответствующими контейнерами; датчики для контроля температуры внутри контейнеров одного или нескольких из модуля дезагрегации; модуля обогащения; и/или модуля стабилизации; по меньшей мере один пузырьковый датчик для управления переносом среды между впускными и выпускными отверстиями каждого контейнера в модуле; по меньшей мере один насос, необязательно перистальтический насос, для управления переносом среды между впускными и выпускными отверстиями; датчики давления для оценки давления внутри модуля обогащения; один или несколько клапанов для управления процессом фильтрации с тангенциальным потоком в модуле обогащения; и/или один или несколько зажимов для управления переносом среды между впускными и выпускными отверстиями каждого модуля.

В другом варианте осуществления программируемый процессор автоматизированного устройства приспособлен для поддержания оптимального диапазона температур хранения в модуле стабилизации до извлечения контейнера; или

выполняет стадию контролируемого замораживания. Это позволяет хранить УТИЛ в течение коротких периодов (от минут до дней) или в течение длительного времени (от нескольких дней до лет) до их окончательного использования в зависимости от типа или процесса стабилизации, используемого с модулем стабилизации.

В другом варианте осуществления автоматизированное устройство дополнительно содержит пользовательский интерфейс. Интерфейс может содержать экран дисплея для отображения инструкций, которые направляют пользователя для ввода параметров, подтверждения предварительно запрограммированных стадий, предупреждения об ошибках или их комбинации.

В другом варианте осуществления автоматизированное устройство приспособлено для транспортировки и, таким образом, может иметь размеры, обеспечивающие легкую маневренность и/или облегчение движения, например, колеса, шины и/или ручки.

Настоящее изобретение также обеспечивает полуавтоматизированный способ асептической обработки ткани для выделения терапевтической популяции криоконсервированных УТИЛ, включающий следующие стадии:

(а) автоматизированное определение стадий асептической обработки ткани путем дезагрегации и связанных с ними условий по цифровой, электронной или электромагнитной метке-идентификатору, связанному с набором для асептической обработки, при этом набор для асептической обработки содержит:

модуль дезагрегации для получения и обработки материала, содержащего солидную ткань млекопитающих;

необязательный модуль обогащения для фильтрации дезагрегированного материала солидной ткани и сегрегации недеагрегированной ткани и фильтрата; и

модуль стабилизации для необязательной дальнейшей обработки и/или хранения дезагрегированного материала продукта,

при этом каждый из модулей содержит один или несколько гибких контейнеров, соединенных одной или несколькими трубками, выполненными с возможностью протекания тканевого материала между ними; и

при этом каждый из модулей содержит один или несколько впускных отверстий для обеспечения возможности асептического ввода среды и/или реагентов в один или несколько гибких контейнеров;

(b) резекцию опухоли у субъекта;

с) помещение опухоли в гибкий пластиковый контейнер модуля дезагрегации асептического набора;

(d) обработка опухоли путем автоматизированного выполнения одной или нескольких стадий обработки ткани путем коммуникации и управления:

модулем дезагрегации; при этом резецированная опухоль подвергается асептической дезагрегации с получением дезагрегированной опухоли, при этом резецированная опухоль является достаточно дезагрегированной, если ее можно криоконсервировать без повреждения клеток;

необязательным модулем обогащения, в котором дезагрегированная опухоль фильтруется для удаления дезагрегированного материала солидной ткани и для сегрегации недезагрегированной ткани и фильтрата;

модулем стабилизации, в котором дезагрегированная опухоль подвергается криоконсервации;

(e) выполнение первого размножения путем культивирования дезагрегированной опухоли в среде для культивирования клеток, содержащей П-2, с получением первой популяции УТЦ;

(f) выполнение второго размножения путем культивирования первой популяции УТЦ с дополнительными П-2, ОКТ-3 и антигенпрезентирующими клетками (АРС) с получением второй популяции ЦЦ;

(g) сбор и/или криоконсервация второй популяции УТЦ. В некоторых вариантах осуществления стадия b) является необязательной.

Гибкие контейнеры, такие как мешки, могут быть использованы для обработки тканевых материалов. Обработка может включать обработки, которые могут отделить или разрушить ткань, например, физическое разрушение может быть выполнено с использованием встряхивания, например, осторожного встряхивания, биологическое и/или ферментативное разрушение может включать ферментативное расщепление и/или экстракцию компонентов тканевых материалов в мешке.

Гибкий контейнер, такой как пакет, для обработки ткани может включать один или несколько слоев, изготовленных из герметизируемого полимера, при этом имеется по меньшей мере три края гибкого контейнера, которые герметизируются во время изготовления, и открытый край на гибком контейнере, через который тканевый материал вводится во время использования. Один или несколько соединителей могут быть использованы для соединения гибкого контейнера по меньшей мере с одним элементом через трубку. После помещения ткани в гибкий контейнер, участок гибкого

контейнера, расположенный рядом с открытым краем, может быть герметизирован или сварен с образованием шва. Шов может иметь ширину по меньшей мере три мм и располагаться по существу параллельно открытому краю и отстоять от открытого края гибкого контейнера. В некоторых случаях шов может иметь ширину больше, чем примерно пять мм. Например, пакет может быть запечатан после помещения ткани внутрь, при этом шов располагается на расстоянии по меньшей мере 5 мм от открытого края пакета. Шов может проходить параллельно открытому краю и отстоять от открытого края пакета.

Гибкий контейнер может быть дополнительно закреплен с помощью зажима, имеющего выступы и расположенного рядом со швом и отстоящего дальше от открытого края гибкого контейнера, чем шов.

В некоторых случаях шов и гибкий контейнер сконструированы таким образом, что гибкий контейнер может выдерживать силу в 100 Н, прилагаемую к гибкому контейнеру во время использования. Использование зажима в сочетании с таким швом в некоторых случаях может быть выгодным в зависимости от типа используемого материала и/или структуры шва. Таким образом, при использовании гибкого контейнера, такого как пакет, комбинация шва и зажима может выдерживать силу в 100 Н, прилагаемую к гибкому контейнеру.

В некоторых случаях шов и гибкий контейнер сконструированы таким образом, что гибкий контейнер может выдерживать силу в 75 Н, прилагаемую к гибкому контейнеру во время использования. Использование зажима в сочетании с таким швом в некоторых случаях может быть выгодным в зависимости от типа используемого материала и/или структуры шва. Таким образом, при использовании гибкого контейнера, такого как пакет, комбинация шва и зажима может выдерживать силу в 75 Н, прилагаемую к гибкому контейнеру.

Гибкий контейнер может быть использован для содержания ткани во время обработки, такой как дезагрегация тканевого материала.

В некоторых вариантах осуществления гибкий контейнер, такой как пакет, может быть использован для дезагрегации тканевого материала, фильтрации дезагрегированного тканевого материала и/или сегрегации недезагрегированной ткани и филтратата.

Гибкие контейнеры, такие как пакеты, могут быть изготовлены из упругого деформируемого материала. Материалы для использования в гибких контейнерах, таких как пакеты, могут быть выбраны по одному или нескольким свойствам, включая,

но без ограничения, способность к герметизации, такую как способность к герметизации при термической сварке или при использовании радиочастотной энергии, газопроницаемость, гибкость, например, гибкость при низких температурах (например, при -150°C или -195°C), эластичность, например, эластичность при низких температурах, химическая стойкость, оптическая прозрачность, биосовместимость, такая как цитотоксичность, гемолитическая активность, устойчивость к выщелачиванию, низкое содержание твердых частиц, высокая скорость проникновения определенных газов (например, кислорода и/или диоксида углерода), и/или соблюдение требований регуляторных органов.

Гибкие контейнеры, такие как пакеты, могут включать индикаторы. Индикаторы могут быть использованы для идентификации образцов, пациентов, от которых были получены образцы, и/или для отслеживания прохождения конкретного образца через процесс обработки. В некоторых случаях индикаторы могут сканироваться автоматизированной или полуавтоматизированной системой для отслеживания прохождения образца.

Метки могут быть использованы на гибком контейнере, таком как пакет, для идентификации того, где пакет должен быть размещен, обработан, запечатан, или произведено любое другое действие, которое может быть предпринято в отношении пакета, содержащего ткань. Каждый пакет может иметь несколько меток для запечатывания.

Открытый конец пакета может быть запечатан после того, как ткань будет помещена в пакет. Любой шов может быть сформирован с использованием запечатывающего устройства (например, теплового запайщика), работающего при заданном давлении, заданной температуре и заданном временном интервале.

В некоторых случаях гибкий контейнер, такой как пакет, может быть использован в качестве контейнера для дезагрегации, предназначенного для использования в составе элемента дезагрегации, который может также включать устройство для дезагрегации. В некоторых вариантах осуществления среда и/или ферменты могут быть добавлены в пакет внутри элемента дезагрегации устройства. Например, пакет может быть использован с устройством, которое механически измельчает тканевый материал, помещенный в гибкий контейнер.

В некоторых вариантах осуществления ткань в гибком контейнере, таком как пакет, может быть разрезана во время дезагрегации. В частности, гибкий контейнер может быть выполнен с возможностью разрезания тканевого материала.

Гибкие контейнеры могут быть использованы в полуавтоматизированном или автоматизированном процессе для асептической дезагрегации, стабилизации и/или необязательного обогащения клеток млекопитающих или клеточных агрегатов.

Набор для извлечения желаемого материала из ткани может включать элемент дезагрегации, в котором по меньшей мере часть ткани обрабатывается с образованием переработанной текучей среды, элемент обогащения (например, фильтр), способный обогатить по меньшей мере часть переработанной текучей среды с образованием желаемого материала, элемент стабилизации, способный хранить часть желаемого материала, и индикаторную метку, расположенную по меньшей мере на одном из элемента дезагрегации, элемента обогащения или элемента стабилизации, способную обеспечить по меньшей мере одно из источника ткани, статуса ткани по отношению к процессу или идентификатора.

Желаемый материал может представлять собой биологический материал или компоненты определенного размера. Например, желаемый материал может представлять собой инфильтрирующие опухоль лимфоциты (TIL).

Различные типы сред могут использоваться во многих процессах, проводимых элементом дезагрегации и элементом стабилизации. Например, в набор может быть включена среда для криоконсервирования, которую можно использовать в элементе стабилизации для контроля скорости замораживания.

Комплект для использования в устройстве, где элемент дезагрегации может включать первый гибкий контейнер и элемент стабилизации может включать второй гибкий контейнер.

Автоматизированное устройство для полуавтоматизированной асептической дезагрегации и/или обогащения, и/или стабилизации клеток или клеточных агрегатов из солидной ткани млекопитающих может включать программируемый процессор и набор, включающий описанный в настоящем документе гибкий контейнер. Автоматизированное устройство может дополнительно включать считыватель индикаторной метки. Например, считыватель индикаторной метки может быть расположен на любом элементе (например, дезагрегации, обогащении или стабилизации тканевого материала в наборе).

В некоторых случаях автоматизированное устройство может дополнительно включать считыватель радиочастотной идентификационной метки для распознавания образцов в гибких контейнерах в комплекте.

Автоматизированное устройство может включать программируемый процессор, способный распознавать индикаторы, расположенные на компонентах набора, таких как пакет, с помощью индикаторной метки, такой как QR-код. После определения того, какой образец находится в пакете, программируемый процессор затем выполняет программу, определяющую тип процессов дезагрегации, обогащения и стабилизации, и обеспечивает соответствующие типы сред, необходимые для этих процессов.

Набор для использования в автоматизированном устройстве может включать гибкий контейнер или пакет для дезагрегации. Программируемый процессор может управлять элементом дезагрегации и гибким контейнером для дезагрегации, чтобы обеспечить физическое и/или биологическое разрушение солидной ткани.

Программируемый процессор может управлять элементами автоматизированного устройства таким образом, что поверхности дезагрегации, расположенные рядом с гибким контейнером для дезагрегации, могут механически измельчать и разрезать солидную ткань в гибком контейнере для дезагрегации, при этом необязательно поверхности дезагрегации представляют собой механические поршни.

Элементы дезагрегации системы могут управляться процессором таким образом, чтобы ткань в гибком контейнере для дезагрегации обеспечивала физическое и ферментативное разрушение твердой ткани. Один или несколько растворов ферментов среды, выбранных из коллагеназы, трипсина, липазы, гиалуронидазы, дезоксирибонуклеазы, либеразы HI, пепсина или их смесей, могут быть помещены в гибкий контейнер для дезагрегации, чтобы способствовать ферментативному разрушению ткани.

Система может включать набор, который включает гибкий контейнер для дезагрегации и гибкий контейнер для стабилизации, а также программируемый процессор. Программируемый процессор может быть адаптирован для управления одним или несколькими из следующих элементов: элемент дезагрегации; элемент обогащения; и элемент стабилизации.

Программируемый процессор может управлять элементом стабилизации для криоконсервации обогащенной дезагрегированной солидной ткани в контейнере для стабилизации. В некоторых вариантах осуществления может быть запрограммирована предварительно определенная температура.

Автоматизированное устройство может включать дополнительные компоненты во множестве комбинаций. Компоненты могут включать датчики, способные

распознавать, завершен ли процесс дезагрегации в модуле дезагрегации перед переносом дезагрегированной солидной ткани в необязательный элемент обогащения, датчики веса для определения количества среды, требуемой в контейнерах одного или нескольких из элемента дезагрегации, элемента обогащения и/или элемента стабилизации, и управления переносом материала между соответствующими контейнерами, датчики для контроля температуры внутри контейнеров одного или нескольких из элемента дезагрегации; элемента обогащения; и/или элемента стабилизации; по меньшей мере один пузырьковый датчик для управления переносом среды между впускными и выпускными отверстиями каждого контейнера в элементе; по меньшей мере один насос, необязательно перистальтический насос, для управления переносом среды между впускными и выпускными отверстиями; датчики давления для оценки давления внутри элемента обогащения; один или несколько клапанов для управления процессом фильтрации с тангенциальным потоком внутри элемента обогащения; и/или один или несколько зажимов для управления переносом среды между впускными и выпускными отверстиями каждого элемента.

Автоматизированное устройство может включать программируемый процессор, адаптированный для поддержания оптимального температурного диапазона хранения в модуле стабилизации до тех пор, пока контейнер не будет извлечен. В одном варианте осуществления программируемый процессор может выполнять стадию контролируемого замораживания.

В некоторых случаях автоматизированное устройство может включать пользовательский интерфейс. Интерфейс автоматизированного устройства может включать экран дисплея для отображения инструкций, которые направляют пользователя для ввода параметров, подтверждения предварительно запрограммированных стадий, предупреждения об ошибках или их комбинации.

Описанное в настоящем документе автоматизированное устройство может быть приспособлено для транспортировки.

Способ автоматизированной обработки ткани может включать автоматизированное определение условий для стадий обработки и связанных с ними условий с помощью цифрового, электронного или электромагнитного индикатора-метки, связанного с компонентом набора. Во время использования образец ткани может быть помещен в гибкий контейнер набора, имеющий по меньшей мере один открытый край. После помещения ткани в гибкий контейнер открытый край может быть запечатан. Во время использования ткань может обрабатываться путем

автоматизированного выполнения одной или нескольких стадий обработки ткани путем передачи информации, связанной с индикатором, и контроля условий вблизи гибкого контейнера и/или положений гибкого контейнера. Кроме того, добавление материалов в набор можно контролировать на основе информации, связанной с индикаторами. По меньшей мере часть обработанной ткани может быть отфильтрована таким образом, что образуется отфильтрованная текучая среда. По меньшей мере часть отфильтрованной текучей среды может быть помещена в гибкий контейнер для криоконсервации для стабилизации желаемого материала, присутствующего в отфильтрованной текучей среде.

Обработка, описанная в настоящем документе, может включать перемешивание, экстракцию и ферментативное расщепление по меньшей мере части образца ткани в гибком контейнере. В некоторых случаях эта обработка ткани может привести к извлечению желаемого материала из образца ткани. Например, из образца ткани могут быть извлечены инфильтрирующие опухоль лимфоциты (TIL).

Гибкие контейнеры, такие как пакеты, для использования в описанных в настоящем документе способах могут включать термосвариваемый материал.

Обработка ткани и извлечение из тканевых материалов с использованием набора для криоконсервации может привести к выделению желаемого материала. В частности, желательным материалом могут являться такие материалы, как инфильтрирующие опухоль лимфоциты (TIL).

В некоторых случаях набор для криоконсервации и/или его компоненты, описанные в настоящем документе, могут быть одноразовыми в автоматизированном и/или полуавтоматизированном процессе дезагрегации, обогащения и/или стабилизации клеток или клеточных агрегатов. В некоторых вариантах осуществления пакеты для использования в наборе для криоконсервации, такие как пакет для сбора, в некоторых вариантах осуществления могут быть использованы для нескольких процессов. Например, пакеты для сбора могут быть многократно запечатаны в разных местах для создания отдельных отсеков для обработки образца ткани, такого как образец биопсии и/или солидная ткань.

Гибкие контейнеры, такие как пакеты, для использования в изобретении, описанном в настоящем документе, включают пакет для сбора и пакет для криоконсервации может включать по меньшей мере часть, изготовленную из предварительно определенного материала, такого как термопласт, полиолефиновый полимер, этиленвинилацетат (EVA), смеси, такие как сополимеры, например, смесь

винилацетата и полиолефинового полимера (например, пленка OriGen Biomedical EVO), материал, который включает EVA, и/или соэкструдированные слои герметизируемых пластиков. Пакет для сбора, такой как пакет для сбора ткани по изобретению, может включать пакет для приема ткани, изготовленный из предварительно определенного материала, такого как этиленвинилацетат (EVA) и/или материал, включающий EVA. Материалы для использования в пакете могут быть выбраны по определенным свойствам. В одном варианте осуществления пакеты, включая пакеты для сбора, могут быть изготовлены в основном из смеси винилацетата и полиолефинового полимера. Например, представляющее интерес свойство, которое может быть использовано для выбора материала для компонента набора для криоконсервации, такого как пакет для сбора и/или связанных с ним трубок, может относиться к термосвариванию.

Материалы, предназначенные для использования в пакете могут быть выбраны по определенному свойству и/или набору свойств, например, способности к запечатыванию, такой как способность к термосвариванию, газопроницаемости, гибкости, например, гибкости при низких температурах, эластичности, например, эластичности при низких температурах, химической стойкости, оптической прозрачности, биосовместимости, такой как цитотоксичность, гемолитической активности, устойчивости к выщелачиванию, низкому содержанию твердых частиц.

В некоторых вариантах осуществления материалы могут быть выбраны по конкретным свойствам для использования в соэкструдированном материале для формирования по меньшей мере одного слоя пакета. Слои могут быть сконструированы таким образом, что сконструированный внутренний слой пакета является относительно биосовместимым, то есть материал на внутренней поверхности пакета является стабильным и не просачивается в содержимое пакета.

Например, представляющее интерес свойство, которое может быть использовано для выбора материала для компонента набора, такого как пакет для сбора, пакет для криоконсервации и/или связанные с ними трубки, может относиться к запечатыванию, например, термосвариванию.

Пакеты, такие как пакеты для сбора и/или пакеты для криоконсервации, и любые связанные с ними трубки могут быть, как правило, светлыми, прозрачными, полупрозрачными, любого желаемого цвета или их комбинацией. Пакеты для сбора ткани и/или трубки могут быть, как правило, изготовлены способами, аналогичными изготовлению закрытых и/или запечатанных пакетов для крови и/или криоконсервации

и связанных с ними трубок. Трубки в изобретении могут быть изготовлены из любого желаемого материала, включая, но без ограничения, поливинилхлорид (PVC). Например, PVC может быть желательным материалом, поскольку PVC лучше всего подходит для сварки и/или запечатывания.

В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один конец пакета для сбора может быть открыт для приема ткани. В частности, в одном варианте осуществления образец ткани, например, полученный методом биопсии, может быть помещен в пакет через открытый конец, например, верхний конец. В некоторых случаях образец, полученный путем биопсии, может представлять собой раковую ткань от животного (например, домашнего животного, такого как собака или кошка) или человека.

После того, как ткань помещена в пакет, пакет может быть запечатан, а затем может быть обработан. Обработка может включать встряхивание, например, осторожное встряхивание, извлечение и/или ферментативное расщепление ткани в пакете. Обработка тканей и извлечение желаемого материала, такого как инфильтрирующие опухоль лимфоциты (TIL), могут осуществляться в закрытой системе. Преимущественные или предпочтительные варианты осуществления могут включать индикаторы для идентификации пациента, у которого была взята ткань, и/или метки, показывающие, был ли пакет для сбора закрыт зажимом, запечатан, подвергнут воздействию устройства и/или закреплен на месте в приборе.

В некоторых вариантах осуществления пакет может быть изготовлен из запечатываемого материала. Например, пакет может быть изготовлен из материалов, включая, но без ограничения, полимеры, такие как синтетические полимеры, включая алифатические или полуароматические полиамиды (например, нейлон), этиленвинилацетат (EVA) и их смеси, термопластичные полиуретаны (TPU), полиэтилены (PE), смеси винилацетата и полиолефиновых полимеров и/или комбинации полимеров. Части пакета могут быть запечатаны и/или сварены с помощью энергии, такой как тепло, радиочастотная энергия, высокочастотная (HF) энергия, диэлектрическая энергия, и/или любым другим способом, известным в данной области.

Пакет для сбора может быть использован в качестве пакета для обработки и/или дезагрегации. Пакеты для сбора могут иметь ширину в диапазоне от примерно 4 см до примерно 12 см и ширину в диапазоне от примерно 10 см до примерно 30 см. Например, мешок для сбора для использования в обработке может иметь ширину

примерно 7,8 см и длину примерно 20 см. В частности, мешок может быть термосвариваемым, например, с использованием полимера EVA или его смесей, смеси винилацетата и полиолефинового полимера и/или одного или нескольких полиамидов (нейлона).

Индикаторы могут включать, но без ограничения, коды, буквы, слова, имена, буквенно-цифровые коды, числа, изображения, штрих-коды, коды быстрого ответа (QR), метки, трекеры, такие как трекер-метки Smart Tracker Tags или Bluetooth-трекеры, и /или любой индикатор, известный в данной области техники. В некоторых вариантах осуществления индикаторы могут быть напечатаны, протравлены и/или приклеены к поверхности компонента набора. Индикаторы также могут быть размещены на пакете с помощью клея, например, наклейка или трекер могут быть размещены на пакете и/или на нескольких пакетах. Пакеты для сбора и/или набор для криоконсервации могут включать несколько индикаторов, таких как числовые коды и/или QR-коды.

Индикаторы, например QR-коды, метки, такие как смарт-теги, и/или трекеры, могут быть использованы для идентификации образца в пакете, а также для указания процессору устройства, чтобы устройство запускало конкретную программу в соответствии с типом процессов дезагрегации, обогащения и/или стабилизации, проводимых в наборах для криоконсервации. В этих процессах могут быть использованы различные типы сред, например, ферментные среды, среды для расщепления опухолей и/или среды для криоконсервации, которые могут обеспечивать контролируемую скорость замораживания. В некоторых вариантах осуществления набор для криоконсервации и/или его компоненты могут включать индикаторы, которые могут считываться автоматизированным устройством. Затем устройство может выполнять специальный полностью автоматизированный способ обработки ткани при помещении в такое устройство. Изобретение является особенно полезным при обработке образцов, в частности, автоматизированной обработке. В некоторых случаях набор для криоконсервации и/или его компоненты, описанные в настоящем документе, могут быть одноразовыми в автоматизированном и/или полуавтоматизированном процессе дезагрегации, обогащения и/или стабилизации клеток или клеточных агрегатов. В некоторых вариантах осуществления пакеты для использования в наборе для криоконсервации, такие как пакет для сбора, в некоторых вариантах осуществления могут использоваться для нескольких процессов. Например, пакеты для сбора могут быть многократно запечатаны в разных местах для создания

отдельных отделений для обработки образца ткани, такого как образец, полученный путем биопсии, и/или образец солидной ткани.

Кроме того, метки могут быть размещены в различных местах на пакетах, таких как пакеты для сбора ткани, для указания того, что пакеты могут быть запечатаны, соединены зажимом и/или прикреплены к объекту. В некоторых вариантах осуществления метки, указывающие на то, что пакет соединен зажимом, запечатан и/или прикреплен к объекту, такому как прибор, могут быть размещены на пакете перед использованием. Например, одна или несколько меток могут быть расположены на пакете во время изготовления.

Позиционеры могут быть использованы для гарантии обработки надлежащим образом тканевого материала в пакетах во время использования, например, для размещения вблизи прибора. В некоторых системах позиционеры могут облегчать использование описанных в настоящем документе пакетов в автоматизированных системах. В частности, позиционеры могут быть использованы для перемещения пакета через автоматизированную систему.

Использование индикатора, такого как QR-код, может позволить отслеживать стадии процесса для конкретного образца, так что можно следить за образцом на протяжении данного процесса.

Изобретение включает и обеспечивает терапевтические клеточные популяции, как описано в следующих пронумерованных параграфах:

Соответственно, цель изобретения состоит в том, чтобы не охватывать в рамках изобретения какой-либо ранее известный продукт, процесс изготовления продукта или способ использования продукта, так что заявители сохраняют за собой право отказаться и настоящим заявляют об отказе от исключительных прав на любой ранее известный продукт, процесс или способ. Кроме того, следует отметить, что изобретение не предназначено для включения в объем изобретения какого-либо продукта, процесса или изготовления продукта, или способа использования продукта, который не соответствует требованиям к письменному описанию и достаточности раскрытия USPTO 35 U.S.C. §112, первый абзац) или ЕРО (статья 83 ЕРС), так что заявители сохраняют за собой право и настоящим заявляют об отказе от исключительных прав на любой ранее описанный продукт, процесс изготовления продукта или способ использования продукта. При осуществлении на практике изобретения желательно соблюдать Ст. 53(с) ЕРС и Правила 28(b) и (с) ЕРС. Все права на явный отказ от исключительных прав на любые варианты осуществления, которые

являются предметом любого выданного патента(ов) заявителя в линии данной заявки или в любой другой линии, или в любой ранее поданной заявке любой третьей стороны, однозначно сохранены. Ничто здесь не должно быть истолковано как обещание.

Следует отметить, что в этом раскрытии и, в частности, в пунктах и/или параграфах формулы изобретения, такие термины, как «содержит», «содержащийся», «содержащий» и т.п., имеют значение, присвоенное им в патентном законодательстве США; например, они могут означать «включает», «включенный», «включающий» и т.п.; и что такие термины, как «состоящий по существу из» и «состоит по существу из» имеют значение, присвоенное им в патентном законодательстве США, например, они допускают наличие элементов, не упомянутых явным образом, но исключают элементы, которые встречаются в известном уровне техники или которые влияют на базовые или новые характеристики изобретения.

Эти и другие варианты осуществления раскрыты или очевидны из последующего подробного описания и охватываются им.

Краткое описание чертежей

Файл патента или заявки содержит по меньшей мере один чертеж, выполненный в цвете. Копии публикации этого патента или патентной заявки с цветным чертежом(ами) будут предоставлены Ведомством по запросу и после уплаты необходимой пошлины.

Следующее подробное описание, представленное в качестве примера, но не предназначенное для ограничения изобретения исключительно описанными конкретными вариантами осуществления, может быть лучше всего понято в сочетании с прилагаемыми чертежами.

Фиг. 1 представляет собой схематическое изображение гибкого контейнера для дезагрегации и расщепления материала солидной ткани.

Фиг. 2a представляет собой схематическое изображение ряда фильтровальных модулей, которые направляют расщепленный материал солидной ткани в последующие модули или в контейнер для отходов.

Фиг. 2b представляет собой схематическое изображение гибкого контейнера для обогащения клеток после расщепления и удаления отходов.

Фиг. 2с представляет собой схематическое изображение другого варианта осуществления гибкого контейнера для обогащения клеток после расщепления и удаления отходов.

Фиг. 3а представляет собой схематическое изображение гибкого контейнера для стабилизации клеток после дезагрегации материала солидной ткани и/или обогащения клеток.

Фиг. 3б представляет собой схематическое изображение другого варианта осуществления гибкого контейнера, содержащего соединения с дополнительными гибкими контейнерами для стабилизации клеток посредством криоконсервации после дезагрегации материала солидной ткани и/или обогащения клеток.

Фиг. 4 представляет собой схематическое изображение асептического набора.

Фиг. 5 представляет собой гистограмму, показывающую наблюдаемое кратное изменение в популяции клеток, полученных в результате процесса дезагрегации, для различного времени дезагрегации в диапазоне от нескольких секунд до нескольких часов.

Фиг. 6 представляет собой схему, описывающую полуавтоматизированный способ асептической обработки ткани с использованием нескольких гибких контейнеров для различных исходных растворов, являющихся частью модулей процесса, используемых для дезагрегации и стабилизации.

Фиг. 7 представляет собой схему, которая описывает, каким образом гибкие контейнеры, содержащие среду, используемую в процессе, могут совместно использоваться модулями набора для асептической обработки и способа.

На фиг. 8 показан общий обзор способа генерации ТП.

На фиг. 9 показан обзор сбора и обработки исходного материала опухоли.

На фиг. 10 показан общий вид процесса получения ТП.

На фиг. 11А показан вид варианта осуществления набора для обработки и хранения тканевых материалов.

На фиг. 11В показан вид варианта осуществления набора для обработки и хранения тканевых материалов.

На фиг. 11С показан вид варианта осуществления набора для обработки и хранения тканевых материалов.

На фиг. 11D показан вариант осуществления набора для обработки и хранения тканевых материалов.

На фиг. 12А показан вид в перспективе варианта осуществления пакета для сбора.

На фиг. 12В показан вид в перспективе варианта осуществления пакета для сбора.

На фиг. 12С показан вид в перспективе варианта осуществления пакета для сбора.

На фиг. 12D показан вид в перспективе варианта осуществления пакета для сбора.

На фиг. 12Е показан вид в перспективе варианта осуществления пакета для сбора.

На фиг. 13А показан вид спереди варианта осуществления пакета для сбора.

На фиг. 13В показан вид спереди варианта осуществления пакета для сбора.

На фиг. 13С показан вид спереди варианта осуществления пакета для сбора.

На фиг. 13D показан вид спереди варианта осуществления пакета для сбора.

На фиг. 13Е показан вид спереди варианта осуществления пакета для сбора.

На фиг. 14 показан вид сзади варианта осуществления пакета для сбора.

На фиг. 15 показан вид сбоку варианта осуществления пакета для сбора.

На фиг. 16А показан вид сверху варианта осуществления пакета для сбора.

На фиг. 16В показан вид снизу варианта осуществления пакета для сбора.

На фиг. 17А показан вид сверху варианта осуществления частично открытого пакета для сбора ткани для запечатывания в нем ткани для обработки согласно изобретению, где пакет имеет запечатанные края.

На фиг. 17В показан вид снизу варианта осуществления открытого пакета для сбора ткани для запечатывания в нем ткани для обработки согласно изобретению, где пакет имеет запаянные края.

На фиг. 18А показан вид сверху варианта осуществления частично открытого пакета для сбора ткани для запечатывания в нем ткани для обработки согласно изобретению.

На фиг. 18В показан вид сверху варианта осуществления полностью открытого мешка для сбора ткани для запечатывания в нем ткани для обработки в соответствии с изобретением.

На фиг. 19А показан вид сверху варианта осуществления частично открытого пакета для сбора ткани для запечатывания в нем ткани для обработки согласно

изобретению, где пакет имеет запечатанные края, имеющие предварительно определенную ширину.

На фиг. 19В показан вид сверху варианта осуществления полностью открытого пакета для сбора ткани для запечатывания в нем ткани для обработки согласно изобретению, где пакет имеет запечатанные края, имеющие предварительно определенную ширину.

На фиг. 20А показан вид спереди варианта осуществления пакета для сбора.

На фиг. 20В показан вид спереди варианта осуществления пакета для сбора.

На фиг. 20С показан вид спереди варианта осуществления пакета для сбора.

На фиг. 20D показан вид спереди варианта осуществления пакета для сбора.

На фиг. 20Е показан вид спереди варианта осуществления пакета для сбора.

На фиг. 21А показан вид спереди варианта осуществления пакета для сбора.

На фиг. 21В показан вид спереди варианта осуществления пакета для сбора.

На фиг. 21С показан вид спереди варианта осуществления пакета для сбора.

На фиг. 21D показан вид спереди варианта осуществления пакета для сбора.

На фиг. 21Е показан вид спереди варианта осуществления пакета для сбора.

На фиг. 22А показан вид спереди варианта осуществления пакета для сбора.

На фиг. 22В показан вид спереди варианта осуществления пакета для сбора.

На фиг. 22С показан вид спереди варианта осуществления пакета для сбора.

На фиг. 22D показан вид спереди варианта осуществления пакета для сбора.

На фиг. 23 показан вид спереди варианта осуществления пакета для сбора.

На фиг. 24 показан вид спереди варианта осуществления пакета для сбора.

На фиг. 25 показан вид спереди варианта осуществления пакета для сбора.

На фиг. 26 показан вид спереди варианта осуществления пакета для сбора, соединенного с трубкой и впускным отверстием.

На фиг. 27А показан вид спереди варианта осуществления пакета для сбора перед использованием.

На фиг. 27В показан вид спереди варианта осуществления пакета для сбора, который был запечатан, например, после помещения материала внутрь пакета.

На фиг. 28 показан вид сверху варианта осуществления набора для криоконсервации, обращенного вверх, включающего открытый пакет для сбора и пакет для криоконсервации.

На фиг. 29 показан вид сверху варианта осуществления набора для криоконсервации, обращенного вниз, включающего пакет для сбора с указанием, где он должен быть закрыт, и пакет для криоконсервации.

На фиг. 30 показан вид сверху варианта осуществления набора для криоконсервации, обращенного вверх, включающего закрытый пакет для сбора и пакет для криоконсервации.

На фиг. 31 показан вид сбоку варианта осуществления набора для криоконсервации, обращенного вверх, включающего закрытый пакет для сбора и пакет для криоконсервации.

На фиг. 32 показан вид с торца варианта осуществления набора для криоконсервации.

На фиг. 33 показан вид сверху варианта осуществления пакета для сбора, включающего отметки, соединенные с трубкой.

На фиг. 34 показан вид спереди варианта осуществления набора для криоконсервации, который включает пакет для сбора, фильтр и пакет для криоконсервации.

На фиг. 35 показан вид спереди варианта осуществления набора для криоконсервации, который включает пакет для сбора, фильтр и пакет для криоконсервации.

На фиг. 36А показан вид спереди варианта осуществления набора для криоконсервации, который включает пакет для сбора, фильтр и пакет для криоконсервации.

На фиг. 36В показан вид сбоку варианта осуществления пакета для сбора, закрепленного с помощью зажима, шарнира и защелки, а также перекладки, располагающейся рядом с поверхностью мешка для сбора во время использования.

На фиг. 36С показан вид в разобранном виде зажима, расположенного на пакете для сбора.

На фиг. 37 показан вид спереди варианта осуществления набора для криоконсервации, который включает пакет для сбора, фильтр и пакет для криоконсервации.

На фиг. 38 показан вид спереди варианта осуществления набора для криоконсервации, который включает пакет для сбора, фильтр и пакет для криоконсервации.

На фиг. 39 показан вид спереди варианта осуществления пакета для сбора, закрепленного зажимом.

На фиг. 40 показан вид спереди варианта осуществления пакета для сбора.

На фиг. 41 показан вид спереди продавливающего устройства для дезагрегации ткани на отдельные клетки или скопления клеток в закрытом контейнере для образцов.

На фиг. 42 и фиг. 43 показано устройство, представленное на фиг. 41, в двух разных рабочих положениях; на фиг. 44 показан вид сверху устройства, показанного на предыдущих фигурах.

На фиг. 45 показан другой вид сверху альтернативной конструкции устройства.

На фиг. 46, 47 и 48 показаны три различных конструкции контейнера для образцов, пригодных для использования с устройством, представленным на фиг. 41-45.

На фиг. 49 показан пакет для образцов, подготовленный для использования.

На фиг. 51a, 51b и 51c показаны альтернативные способы запечатывания пакета для образцов.

На фиг. 52, 53 и 54 показано устройство и способы подготовки пакета к использованию.

На фиг. 55 показана загрузка пакета или контейнера для образцов в продавливающее устройство.

На фиг. 56, 57 и 58 показано устройство для разделения дезагрегированного образца.

На фиг. 59, 60 и 61 показано устройство для контроля температуры образца или разделенного образца.

На фиг. 62-64 показан еще один вариант осуществления продавливающего устройства.

На фиг. 65 представлена иллюстративная блок-схема сбора, обработки и криоконсервации опухолевой ткани.

На фиг. 66 представлена иллюстративная блок-схема получения ТП из обработанной и криоконсервированной опухолевой ткани.

На фиг. 67 сравниваются выход (фиг. 67А), процентная жизнеспособность (фиг. 67В) и процент CD3+ Т-клеток (фиг. 67С) криоконсервированных и свежих дезагрегированных клеточных суспензий.

На фиг. 68А и 68В сравнивают жизнеспособность РВМС, криоконсервированных с коммерчески доступными криоконсервантами.

На фиг. 69 сравнивается жизнеспособность РВМС, расщепленных, а затем криоконсервированных в соответствии с протоколом, согласно которому материал выдерживали при 4°C в течение 10 минут, а затем снижали температуру со скоростью -1°C/мин или снижали напрямую с 35°C до -80°C со скоростью -2°C/мин.

На фиг. 70 показано сравнение температур, записанных с пакетов с образцами в соответствии с протоколом, согласно которому материал выдерживали при 4°C в течение 10 минут, затем снижали температуру со скоростью -1°C/мин или снижали с 35°C до -80°C напрямую со скоростью -2°C/мин.

На фиг. 71 показана дезагрегация и криоконсервация TIL077: (A) заданная скорости дезагрегатора; (B) регистрация скорости дезагрегатора; (C) заданная температура (дезагрегация); (D) регистрация температуры криопластины (дезагрегация); (E) заданная температура (криоконсервация); (F) регистрация температуры (криоконсервация); (G) заданная скорость охлаждения; (H) регистрация скорости охлаждения криопластины.

На фиг. 72 показана дезагрегация Tiss-U-Stor и криоконсервация TIL078 (1 из 2 пакетов): (A) заданная скорость дезагрегатора; (B) регистрация скорости дезагрегатора; (C) заданная температура (дезагрегация); (D) регистрация температуры криопластины (дезагрегация); (E) заданная температура (криоконсервация); (F) регистрация температуры (криоконсервация); (G) заданная скорость охлаждения; (H) регистрация скорости охлаждения криопластины.

На фиг. 73 показана дезагрегация Tiss-U-Stor и криоконсервация TIL078 в непрерывном процессе: (A) заданная скорость дезагрегатора; (B) регистрация скорости дезагрегатора; (C) заданная температура (дезагрегация и криоконсервация); (D) регистрация температуры криопластины (дезагрегация и криоконсервация); (E) заданная скорость охлаждения (дезагрегация и криоконсервация); (F) регистрация скорости охлаждения криопластины (дезагрегация и криоконсервация).

На фиг. 74 показан каскадную диаграмму, показывающий наилучший общий ответ и процентное изменение опухолевой нагрузки. CR, полный ответ; PD, прогрессирующее заболевание; PR, частичный ответ; SD, стабильное заболевание. Опухолевая нагрузка определяется как сумма диаметров целевых поражений; изменение опухолевой нагрузки определяется как изменение от исходного уровня до низшего уровня после исходного. Минимальную сумму диаметров целевых поражений (SLD) после исходного уровня, равную 0, использовали у обоих пациентов с CR, которые не имели признаков целевых поражений, подтвержденных во время визитов,

когда проводили оценку на CR (не наблюдалось заболевания или метастазов при КТ/МРТ-сканировании). Один субъект с наилучшим общим ответом PD не имел каких-либо подтвержденных признаков целевых поражений после лечения (прогрессирование определялось наблюдением новых поражений) и, следовательно, он не представлен на диаграмме.

На фиг. 75 показано время общей выживаемости. (A) Медианное время общей выживаемости (OS) для всех подвергнутых лечению пациентов в количестве 21 человек составило 21,3 месяца. (B) Медианное время OS для 15 пациентов с количественными данными ответа составило 16 месяцев. (C) Медианное время OS для нереспондеров (N = 7) составило 6,5 месяцев. Медианное время OS для респондеров (только количественный ответ, N = 8) не было достигнуто.

На фиг. 76 показаны характеристики полученных ТП. (A) Количество клеток на стадии выращивания ТП (стадия 1) полномасштабных циклов ITIL-168 GMP. (B) Количество клеток на стадии ТП REP (стадия 2) полномасштабных циклов ITIL-168 GMP. (C) Процентная жизнеспособность (% жизнеспособных клеток CD3+) во время полномасштабных циклов ITIL-168 GMP.

Подробное описание изобретения

Если не указано иное, все технические и научные термины, используемые в настоящем документе, имеют то же значение, которое обычно понимается специалистом в области, к которой относится данное изобретение.

Термин «анти-CD3 антитело» относится к антителу или его варианту, например, моноклональному антителу и включает человеческие, гуманизированные, химерные, мышинные антитела или антитела млекопитающих, которые направлены против рецептора CD3 в рецепторе антигена Т-клетки зрелых Т-клеток человека. Анти-CD3 антитела включают ОКТ-3, также известное как муромонаб. Анти-CD3 антитела также включают клон УНСТ1, также известный как Т3 и CD3.эпсилон. Другие анти-CD3 антитела включают, например, отеликсизумаб, теплизумаб и визилизумаб.

Когда указывается «противоопухолевое эффективное количество», «ингибирующее опухоль эффективное количество» или «терапевтическое количество», точное количество вводимых композиций по настоящему изобретению может быть определено врачом с учетом индивидуальных различий в возрасте, массе, размере опухоли, степени инфекции или метастаз и состояния пациента (субъекта). В целом можно утверждать, что фармацевтическая композиция, содержащая инфильтрирующие

опухоль лимфоциты (например, вторичные ТЛ или генетически модифицированные цитотоксические лимфоциты), описанная в настоящем документе, может вводиться в дозе 10^4 - 10^{11} клеток/кг массы тела (например, 10^5 - 10^6 , 10^5 - 10^{10} , 10^5 - 10^{11} , 10^6 - 10^{10} , 10^6 - 10^{11} , 10^7 - 10^{11} , 10^7 - 10^{10} , 10^8 - 10^{11} , 10^8 - 10^{10} , 10^9 - 10^{11} или 10^9 - 10^{10} клеток/кг массы тела), включая все целочисленные значения в этих диапазонах. Композиции инфильтрирующих опухоль лимфоцитов (включая в некоторых случаях генетически модифицированные цитотоксические лимфоциты) также можно вводить множество раз в этих дозировках. Инфильтрирующие опухоль лимфоциты (в том числе в некоторых случаях генетически модифицированные цитотоксические лимфоциты) можно вводить, используя методы 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 может легко определяться специалистом в области медицины посредством мониторинга пациента относительно признаков заболевания и соответствующего подбора лечения.

Термины «совместное введение», «сочетанное введение», «вводимые в сочетании с», «введение в сочетании с», «одновременно» и «вместе», используемые в настоящем документе, охватывают введение двух или более активных фармацевтических ингредиентов (в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, например, по меньшей мере, одного агониста калиевых каналов в сочетании с множеством ТЛ) субъекту, так что как активные фармацевтические ингредиенты, так и/или их метаболиты присутствуют у субъекта в одно и то же время. Совместное введение включает одновременное введение отдельных композиций, введение в различные моменты времени в отдельных композициях или введение в композиции, в которой присутствуют два или более активных фармацевтических ингредиентов. Одновременное введение в отдельных композициях и введение в композиции, в которой присутствуют оба агента, являются предпочтительными.

Термин «целлюляризованные или целлюляризация», используемый в настоящем документе, относится к процессу дезагрегации, при котором многоклеточный материал солидной ткани, обычно состоящий из множества линий/типов клеток, разрушается на малое количество клеток, включая, но без ограничения, одну клетку, но может быть множество клеток различных клеточных линий или типов в очень малых количествах, т.е. скопление клеток или клеточные агрегаты.

Термин «замкнутая система», используемый в настоящем документе, относится к системе, которая является замкнутой для окружающей среды снаружи нее. В способах по настоящему изобретению может быть использована любая замкнутая система, пригодная для способов культивирования клеток. Замкнутые системы включают, например, но без ограничения, закрытые контейнеры G-Rex или пакеты для клеточных культур. После того, как сегмент опухоли добавляют в замкнутую систему, систему не открывают для окружающей среды снаружи, пока ТПЛ не будут готовы для введения пациенту. В предпочтительном варианте осуществления закрытая система представляет собой систему, раскрытую в публикации PCT WO 2018/130845.

Термин «среды для криоконсервирования» или «среда для криоконсервирования», используемый в настоящем документе, относится к любой среде, которую можно использовать для криоконсервирования клеток. Такие среды могут включать среды, содержащие 2%-10% DMSO. Примеры сред включают CryoStor CS10, HypoThermosol, Bloodstor BS-55, а также их комбинации.

Термин «криоконсервированные ТПЛ» в настоящем документе означает, что ТПЛ, либо первичные, либо объемные, либо размноженные (REP ТПЛ), процессируются и хранятся в диапазоне примерно от -190°C до -60°C . Общие способы криоконсервирования также описаны в настоящем документе в другом месте, включая Примеры. Для ясности, «криоконсервированные ТПЛ» отличаются от замороженных образцов тканей, которые можно использовать как источник первичных ТПЛ.

Термин «истощение», используемый в настоящем документе, относится к процессу негативной селекции, который отделяет желательные клетки от нежелательных клеток, которые помечены одним маркер-связывающим фрагментом, связанным с твердой фазой.

Термин «деагрегация или дезагрегировать», используемый в настоящем документе, относится к трансформации солидной ткани в единичные клетки или агрегаты с небольшим числом клеток, где единичная клетка в виде сфероида имеет диаметр в диапазоне 5 мкм, 6 мкм, 7 мкм, 8 мкм, 9 мкм, 10 мкм, 20 мкм, 30 мкм, 40 мкм, 50 мкм, 60 мкм, 70 мкм, 80 мкм, 90 мкм, 100 мкм или более, причем чаще всего от 7 до 20 мкм.

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, но не ограничиваясь этим, лечение

заболевания. Терапевтически эффективное количество может варьироваться в зависимости от предполагаемого применения (*in vitro* или *in vivo*), субъекта и болезненного состояния, подлежащего лечению (например, от массы, возраста и пола субъекта), от тяжести болезненного состояния или от способа введения. Этот термин также применяется к дозе, которая вызывает конкретную реакцию в клетках-мишенях (например, уменьшение адгезии тромбоцитов и/или миграции клеток). Конкретная доза будет варьироваться в зависимости от конкретных выбранных соединений, режима дозирования, которому необходимо следовать, от того, вводят ли соединение в комбинации с другими соединениями, от временного графика введения, от ткани, в которую его вводят, и от физической системы доставки, в которой переносится соединение.

Термин «инженерный», используемый в настоящем документе, относится либо к добавлению нуклеинового материала, либо к факторам, которые изменяют функцию клетки, происходящей из ткани, по сравнению с ее первоначальной функцией, чтобы получить новую или улучшенную функцию для ее конечной полезности.

Термин «ферментная среда», используемый в настоящем документе, относится к среде, обладающей ферментативной активностью, такой как коллагеназа, трипсин, липаза, гиалуронидаза, дезоксирибонуклеаза, либеразы H1, пепсин или их смеси.

Используемый в настоящем документе термин «фильтрат» относится к материалу, который проходит через фильтр, сетку или мембрану.

Термин «гибкий контейнер», используемый в настоящем документе, относится к гибкой упаковочной системе в нескольких форматах с одним или несколькими различными типами пленки. Каждый тип пленки выбирается для обеспечения определенных характеристик для сохранения физических, химических и функциональных характеристик стерильных жидкостей, клеточного материала, полученного из солидных тканей, и целостности контейнера в зависимости от стадии процесса.

«Замораживающий раствор» или «раствор для криоконсервации», также называемый в данной области криопротектором, представляет собой раствор, который содержит криозащитные добавки. Как правило, это проникаемые, нетоксичные соединения, которые изменяют физические нагрузки, которым подвергаются клетки во время замораживания, чтобы свести к минимуму повреждение от замораживания (т.е. вследствие образования льда) и чаще всего представляют собой % об./об. одного или

нескольких из следующих соединений: диметилсульфоксид (DMSO); этиленгликоль; глицерин; 2-метил-2,4-пентандиол (MPD); пропиленгликоль; сахараза; и трегалоза.

Термин «гематологическая злокачественная опухоль» относится к раковым заболеваниям и опухолям кроветворной и лимфоидной тканей млекопитающих, включая, но без ограничения, к тканям крови, костного мозга, лимфатических узлов и лимфатической системы. Гематологические злокачественные опухоли также упоминаются как «жидкие опухоли». Гематологические злокачественные опухоли включают, но без ограничения, острый лимфобластный лейкоз (ALL), хроническую лимфоцитарную лимфому (CLL), малую лимфоцитарную лимфому (SLL), острый миелогенный лейкоз (AML), хронический миелогенный лейкоз (CMML), острый моноцитарный лейкоз (AMoL), лимфома Ходжкина и неходжкинские лимфомы. Термин «гематологическая злокачественная опухоль В-клеток» относится к гематологическим злокачественным опухолям, которые воздействуют на В-клетки.

Термин «IL-2» (также упоминаемый в настоящем документе как «IL2») относится к фактору роста Т-клеток, известному как интерлейкин-2, и включает все формы IL-2, включая формы человека и млекопитающих, консервативные замены аминокислот, гликоформы, биологически подобные соединения и их варианты. IL-2 описан, например, в Nelson, J. Immunol. 2004, 172, 3983-88 и Malek, Annu. Rev. Immunol. 2008, 26, 453-79, раскрытие которых включено в настоящий документ посредством ссылки. Последовательности аминокислот рекомбинантного IL-2 человека, пригодного для использования в изобретении, приведены в таблице 2 (SEQ ID NO: 3). Например, термин IL-2 охватывает рекомбинантные формы IL-2 человека, такие как альдеслейкин (PROLEUKIN, коммерчески доступный от нескольких поставщиков в одноразовых флаконах с 22 миллионами ME), а также форму рекомбинантного IL-2, коммерчески поставляемую CellGenix, Inc., Portsmouth, N.H., USA (CELLGRO GMP) или ProSpec-Tany TechnoGene Ltd., East Brunswick, N.J., USA (Cat. No. CYT-209-b) и другие коммерческие аналоги от других поставщиков. Альдеслейкин (дес-аланил-1, серин-125 IL-2 человека) представляет собой негликозилированную рекомбинантную форму IL-2 человека с молекулярной массой приблизительно 15 кДа. Термин IL-2 также охватывает пегилированные формы IL-2, как описано в настоящем документе, включая пролекарство пегилированного IL2 NKTR-214, доступное от Nektar Therapeutics, South San Francisco, Calif., USA. NKTR-214 и пегилированный IL-2, пригодный для использования в изобретении, описаны в публикации заявки на патент США US 2014/0328791 A1 и в публикации

международной заявки на патент № WO 2012/065086 A1. Альтернативные формы конъюгированного IL-2, пригодные для использования в изобретении, описаны в патентах США №№ 4766106, 5206344, 5089261 и 4902502. Составы IL-2, пригодные для использования в изобретении, описаны в патенте США № 6706289.

Термин «IL-4» (также упоминаемый в настоящем документе как «IL4») относится к цитокину, известному как интерлейкин 4, который продуцируется Т-клетками Th2 и эозинофилами, базофилами и тучными клетками. IL-4 регулирует дифференциацию наивных хелперных Т-клеток (клеток Th0) в Т-клетки Th2. Steinke and Borish, *Respir. Res.* 2001, 2, 66-70. При активации IL-4, Т-клетки Th2 впоследствии продуцируют дополнительный IL-4 в петле положительной обратной связи. IL-4 также стимулирует пролиферацию В-клеток и экспрессию МНС класса II и индуцирует переключение класса на IgE и экспрессию и IgG1 В-клетками. Рекомбинантный IL-4 человека, пригодный для использования в изобретении, коммерчески доступен от нескольких поставщиков, включая ProSpec-Tany TechnoGene Ltd., East Brunswick, N.J., USA (Cat. No. CYT-211) и ThermoFisher Scientific, Inc., Waltham, Mass., USA (рекомбинантный белок IL-15 человека, Cat. No. Gibco CTR0043).

Термин «IL-7» (также упоминаемый в настоящем документе как «IL7») относится к гликозилированному, полученному из ткани 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-рецептора IL-7 и обычного рецептора гамма-цепи, который находится в ряду сигналов, важных для развития Т-клеток в тимусе и выживания на периферии. Рекомбинантный IL-7 человека, пригодный для использования в изобретении, коммерчески доступен от нескольких поставщиков, включая ProSpec-Tany TechnoGene Ltd., East Brunswick, N.J., USA (Cat. No. CYT-254) и ThermoFisher Scientific, Inc., Waltham, Mass., USA (рекомбинантный белок IL-15 человека, Cat. No. Gibco PHC0071).

Термин «IL-12» (также упоминаемый в настоящем документе как «IL12») относится к фактору роста Т-клеток, известному как интерлейкин-12. Интерлейкин (IL)-12 представляет собой секретируемый гетеродимерный цитокин, состоящий из 2 гликозилированных белковых субъединиц, связанных дисульфидной связью, обозначенных p35 и p40 из-за их приблизительной молекулярной массы. IL-12 продуцируется в основном антигенпрезентирующими клетками и управляет клеточно-

опосредованным иммунитетом путем связывания с двухцепочечным рецепторным комплексом, который экспрессируется на поверхности Т-клеток или естественных клеток-киллеров (NK). Цепь бета-1 рецептора IL-12 (IL-12R β 1) связывается с субъединицей p40 IL-12, обеспечивая первичное взаимодействие между IL-12 и его рецептором. Однако именно лигирование IL-12p35 второй рецепторной цепи, IL-12R β 2, обеспечивает внутриклеточную передачу сигналов. Считается, что передача сигналов IL-12 одновременно с презентацией антигена вызывает дифференцировку Т-клеток в сторону фенотипа Т-хелперов 1 (Th1), характеризующегося продукцией гамма-интерферона (IFN γ). Считается, что клетки Th1 способствуют иммунитету к некоторым внутриклеточным патогенам, генерируют комплементсвязывающие изотипы антител, и способствуют иммунологическому надзору за опухолями. Таким образом, считается, что IL-12 является важным компонентом защитных иммунных механизмов хозяина. IL-12 является частью семейства цитокинов IL-12, которое также включает IL-23, IL-27, IL-35, IL-39.

Термин «IL-15» (также упоминаемый в настоящем документе «IL15») относится к фактору роста Т-клеток, известному как интерлейкин-15, и включает все формы IL-15, включая формы человека и млекопитающих, консервативные замены аминокислот, гликоформы, биологически подобные соединения и их варианты. IL-15 описан, например, в работе Fehniger and Caligiuri, Blood 2001, 97, 14-32, раскрытие которой включено в настоящее описание посредством ссылки. IL-15 имеет общие субъединицы сигнальных рецепторов β и γ с IL-2. Рекомбинантный IL-15 человека представляет собой одинарную 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., East Brunswick, N.J., USA (Cat. No. CYT-230-b) и ThermoFisher Scientific, Inc., Waltham, Mass., USA (рекомбинантный белок IL-15 человека, Cat. No. 34-8159-82).

Термин «IL-18» (также упоминаемый в настоящем документе как «IL18») относится к фактору роста Т-клеток, известному как интерлейкин-15. Интерлейкин-18 (IL-18) представляет собой провоспалительный цитокин, который принадлежит к семейству цитокинов IL-1 благодаря своей структуре, семейству рецепторов и путям передачи сигнала. Родственные цитокины включают IL-36, IL-37, IL-38.

Термин «IL-21» (также упоминаемый в настоящем документе как «IL21») относится к плейотропному цитокиновому белку, известному как интерлейкин-21, и

включает все формы IL-21, включая формы человека и млекопитающих, консервативные аминокислотные замены, гликоформы, биологически подобные соединения и их варианты. IL-21 описан, например, в работе Spolski and Leonard, Nat. Rev. Drug. Disc. 2014, 13, 379-95, раскрытие которой включено в настоящий документ посредством ссылки. IL-21 в основном продуцируется естественными Т-клетками киллерами и активированными Т-клетками CD4+ человека. Рекомбинантный IL-21 человека представляет собой одинарную 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., East Brunswick, N.J., USA (Cat. No. CYT-408-b) и ThermoFisher Scientific, Inc., Waltham, Mass., USA (рекомбинантный белок IL-21 человека, Cat. No. 14-8219-80).

Термин «жидкая опухоль» относится к аномальной массе клеток, которая по своей природе является текучей. Жидкие раковые опухоли включают, но без ограничения, лейкемии, миеломы и лимфомы, а также другие гематологические злокачественные опухоли. TIL, полученные из жидких опухолей, также могут упоминаться в настоящем документе как, инфильтрирующие костный мозг лимфоциты (MIL).

«Магнитный» в «магнитной частице», как используется в настоящем документе, относится ко всем подтипам магнитных частиц, которые могут быть получены способами, хорошо известными специалисту в данной области, особенно к ферромагнитным частицам, суперпарамагнитным частицам и парамагнитным частицам. «Ферромагнитные» материалы сильно восприимчивы к магнитным полям и способны сохранять магнитные свойства при снятии поля. «Парамагнитные» материалы обладают лишь слабой магнитной восприимчивостью и при снятии поля быстро теряют свой слабый магнетизм. «Суперпарамагнитные» материалы очень восприимчивы к магнитным полям, т.е. они становятся сильно магнитными при помещении в магнитное поле, но, подобно парамагнитным материалам, быстро теряют свой магнетизм.

Термин «маркер», используемый в настоящем документе, относится к клеточному антигену, который специфически экспрессируется клетками определенного типа. Предпочтительно маркер представляет собой маркер клеточной поверхности, так что можно проводить обогащение, выделение и/или обнаружение живых клеток.

Термин «маркер-связывающий фрагмент», используемый в настоящем документе, относится к любому фрагменту, который предпочтительно связывается с желаемой молекулой-мишенью клетки, то есть с антигеном. Термин «фрагмент» включает, например, антитело или фрагмент антитела. Используемый в настоящем документе термин «антитело» относится к поликлональным или моноклональным антителам, которые могут быть получены с помощью способов, хорошо известных специалистам в данной области. Антитело может быть любого вида, например, мышьиные, крысиные, овечьи, человеческие. В терапевтических целях, если необходимо использовать нечеловеческие антигенсвязывающие фрагменты, их можно гуманизировать любым способом, известным в данной области. Антитела также могут представлять собой модифицированные антитела (например, олигомеры, восстановленные, окисленные и меченые антителами). Термин «антитело» включает как интактные молекулы, так и фрагменты антител, такие как Fab, Fab', F(ab')₂, Fv и одноцепочечные антитела. Кроме того, термин «маркер-связывающий фрагмент» включает любой фрагмент, отличный от антител или фрагментов антител, который предпочтительно связывается с желаемой молекулой-мишенью клетки. Пригодные фрагменты включают, без ограничения, олигонуклеотиды, известные как аптамеры, которые связываются с нужными молекулами-мишенями (Hermann and Pantel, 2000: Science 289: 820-825), углеводы, лектины или любой другой антигенсвязывающий белок (например, взаимодействие рецептор-лиганд).

«Среда» означает различные растворы, известные в области культивирования клеток, обработки клеток и стабилизации, используемые для уменьшения гибели клеток, включая, но без ограничения, одну или несколько из следующих сред: растворы для консервации органов, растворы для селективного лизиса, PBS, DMEM, HBSS, DPBS, RPMI, среду Искова, X-VIVO™, раствор Рингера с лактатом, ацетат Рингера, физиологический раствор, раствор PLASMALYTE™, кристаллоидные растворы и жидкости для внутривенного введения, коллоидные растворы и жидкости для внутривенного введения, пятипроцентная декстроза в воде (D5W), раствор Гартмана. Среда может быть стандартной клеточной средой, такой как упомянутая выше среда, или специальной средой, например, первичной культурой клеток человека (например, для клеток эндотелия, гепатоцитов или кератиноцитов) или стволовых клеток (например, для созревания дендритных клеток, гематопозитической экспансии, кератиноцитов, мезенхимальных стволовых клеток или экспансии Т-клеток). Среда может содержать добавки или реагенты, хорошо известные в данной области,

например, альбумины и транспортные белки, аминокислоты и витамины, антибиотики, факторы прикрепления, факторы роста и цитокины, гормоны, ингибиторы метаболизма или солубилизирующие агенты. Различные среды являются коммерчески доступными, например, от ThermoFisher Scientific или Sigma-Aldrich.

Термин «микроокружение», используемый в данном документе, может относиться к микроокружению солидной или гематологической опухоли в целом или к индивидуальному подмножеству клеток в микроокружении. Микроокружение опухоли, используемое в настоящем документе, относится к сложной смеси «клеток, растворимых факторов, сигнальных молекул, внеклеточных матриксов и механических сигналов, которые способствуют неопластической трансформации, поддерживают рост и инвазию опухоли, защищают опухоль от иммунитета хозяина, стимулируют терапевтическую резистентность и обеспечивают ниши для преобладающего разрастания метастаз», как описано в Swartz, et al., *Cancer Res.*, 2012, 72, 2473. Хотя опухоли экспрессируют антигены, которые должны распознаваться Т-клетками, выведение опухоли под действием иммунной системы является редким из-за иммунного подавления под действием микроокружения.

Термин «негативно разделенный», используемый в настоящем документе, относится к активному разделению клеток, которые связаны одним маркер-связывающим фрагментом, связанным с твердой фазой, и эти клетки не являются требуемой популяцией клеток.

Термин «немеченые» или «нетронутые», используемый в настоящем документе, относится к клеткам, которые не связаны одним маркер-связывающим фрагментом, связанным с твердой фазой. Фракция немеченых нетронутых клеток содержит желаемые клетки-мишени.

Термин «клетки-немишени», используемый в настоящем документе, относится к клеткам, которые специфически связаны одним маркер-связывающим фрагментом, который связан с твердой фазой, используемой для удаления клеток нежелательного типа.

«ОКТ-3» (также упоминаемый в настоящем документе как «ОКТ3») относится к моноклональному антителу или его биологически подобному соединению или к его варианту, включая человеческие, гуманизированные, химерные или мышинные антитела, направленные против рецептора CD3 в рецепторе антигена Т-клетки зрелых Т-клеток и включает коммерчески доступные формы, такие как ОКТ-3 (30 нг/мл, MACS GMP CD3 чистый, Miltenyi Biotec, Inc., San Diego, Calif., USA) и муромонаб

или варианты, консервативные замены аминокислот, гликоформы или их биологически подобные соединения.

«Частица» в данном контексте относится к твердой фазе, такой как коллоидные частицы, микросферы, наночастицы или шарики. Способы получения таких частиц хорошо известны в данной области. Частицы могут быть магнитными частицами или обладать другими селективными свойствами. Частицы могут находиться в растворе или суспензии, или они могут находиться в лиофилизированном состоянии перед использованием в настоящем изобретении. Затем лиофилизированную частицу восстанавливают в подходящем буфере перед контактом с образцом, подлежащим обработке в соответствии с настоящим изобретением.

Термины «моноклеарные клетки периферической крови» и «РВМС» относятся к клеткам периферической крови, имеющим круглое ядро, включая лимфоциты (Т-клетки, В-клетки, НК-клетки) и моноциты. Предпочтительно моноклеарные клетки периферической крови представляют собой облученные аллогенные моноклеарные клетки периферической крови. РВМС представляют собой тип антигенпрезентирующих клеток.

Предполагается, что термины «фармацевтически приемлемый носитель» или «фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество» включают любые и все растворители, дисперсионные среды, покрытия, антибактериальные и противогрибковые агенты, изотонические агенты и агенты, замедляющие абсорбцию, и инертные ингредиенты. Применение таких фармацевтически приемлемых носителей или фармацевтически приемлемых вспомогательных веществ для активных фармацевтических ингредиентов хорошо известно в данной области. За исключением случаев, когда любой обычный фармацевтически приемлемый носитель или фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество является несовместимым с активным фармацевтическим ингредиентом, предполагается его использование в терапевтических композициях по изобретению. Дополнительные активные фармацевтические ингредиенты, такие как другие лекарственные средства, также могут быть включены в описанные композиции и способы.

Под «популяцией клеток» (включая ТП) в настоящем документе подразумевается некоторое количество клеток, которые имеют общие свойства. Как правило, популяции находятся в пределах от 1×10^6 до 1×10^{12} по количеству, при этом различные популяции ТП содержат различные количества.

Под «положительно разделенными» в настоящем документе подразумевается активное разделение клеток, которые связаны одним маркер-связывающим фрагментом, связанным с твердой фазой, и эти клетки представляют собой требуемую популяцию клеток.

Под «отрицательно разделенными» в настоящем документе подразумевается активное разделение клеток, которые связаны одним маркер-связывающим фрагментом, связанным с твердой фазой, и эти клетки не являются требуемой популяцией клеток.

«Чистота», как используется в данном документе, относится к процентному содержанию целевой популяции или популяций, желаемых от исходной солидной ткани.

«Быстрое размножение» означает увеличение количества антиген-специфических ТП по меньшей мере примерно в 3 раза (или в 4, 5, 6, 7, 8 или 9 раз) в течение периода, составляющего неделю, более предпочтительно по меньшей мере примерно в 10 раз (или в 20, 30, 40, 50, 60, 70, 800 или 90 раз) в течение периода, составляющего неделю, более предпочтительно по меньшей мере примерно в 100 раз (или в 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800 или 900 раз) в течение периода, составляющего неделю, или, наиболее предпочтительно, по меньшей мере примерно в 1000 раз или 2000, 3000, 4000, 5000, 6000, 7000, 8000 или 9000 раз) в течение периода, составляющего неделю. Ниже представлен ряд протоколов быстрого размножения.

«Регенеративная медицина(ы)», «адаптивная клеточная терапия(и)» или «лекарственный продукт(ы) передовой терапии» используются в настоящем документе взаимозаменяемо для обозначения клеточного материала, который используется в терапевтических целях одним или несколькими млекопитающими либо посредством: действия части или всего клеточного материала; поддерживающих действий части или всего клеточного материала с целью улучшения самочувствия млекопитающего после применения. Терапевтические клетки могут быть использованы непосредственно или могут потребовать дальнейшей обработки, размножения и/или разработки для обеспечения этих действий.

Используемый в настоящем документе термин «образец» относится к образцу, содержащему клетки в любом соотношении. Предпочтительно эти клетки являются жизнеспособными. В некоторых случаях эти клетки также могут быть фиксированными или замороженными клетками, которые можно использовать для последующего извлечения нуклеиновых кислот или белков. Образцы могут быть

получены от животных, особенно от млекопитающих, таких как мыши, крысы или люди. Можно использовать любую сжимаемую солидную ткань, содержащую клетки. Изобретение иллюстрируется главным образом выделением гемопоэтических и раковых клеток из солидной опухолевой ткани. Однако изобретение относится к способу выделения множества клеток из любой солидной ткани млекопитающего.

«Твердая фаза», как используется в данном документе, относится к связыванию маркер-связывающего фрагмента, например, антитела, связанного с другим субстратом(ами), например, частицы, флуорофоры, гаптены, такие как биотин, полимеры или большие поверхности, такие как чашки для культивирования и планшеты для микротитрования. В некоторых случаях связывание приводит к прямой иммобилизации антигенсвязывающего фрагмента, например, если антигенсвязывающий фрагмент связан с большей поверхностью чашки для культивирования. В других случаях это связывание приводит к непрямой иммобилизации, т.е. антигенсвязывающий фрагмент, связанный прямо или опосредованно (через, например, биотин) с магнитным шариком, иммобилизуется, если указанный шарик удерживается в магнитном поле. В других случаях связывание антигенсвязывающего фрагмента с другими молекулами приводит не к прямой или опосредованной иммобилизации, а к обогащению, разделению, выделению и обнаружению клеток в соответствии с настоящим изобретением, т.е. если маркер-связывающий фрагмент соединен с химическим или физическим фрагментом, который затем позволяет различать меченые клетки и немеченые клетки, например, с помощью методов проточной цитометрии, таких как сортировка FACS или флуоресцентная микроскопия.

Термин «солидная ткань», как используется в настоящем документе, относится к кусочку или кусочкам полученной от млекопитающего солидной ткани, которая по своим трем направлениям измерения, т.е. по длине, ширине и толщине, как геометрическое тело больше, чем размер множества индивидуальных клеточных единиц, и часто содержит соединительные материалы, такие как коллаген или аналогичный матрикс, которые составляют структуру ткани, благодаря чему указанная солидная ткань не может протекать через трубки или собираться с помощью шприца или аналогичного небольшого кондуита или резервуара, т.е., имеет размеры в диапазоне 500 мкм, 1 мм, 2 мм, 3 мм, 4 мм, 5 мм, 1 см, 2 см, 3 см, 4 см, 5 см, 10 см, 20 см, 30 см или более.

Термин «солидная опухоль» относится к аномальной массе ткани, которая обычно не содержит кист или жидких областей. Солидные опухоли могут быть доброкачественными или злокачественными. Термин «солидная раковая опухоль» относится к злокачественным, неопластическим или раковым солидным опухолям. Солидные раковые опухоли включают, но без ограничения, саркому, карциному и лимфому, например, рак легкого, молочной железы, предстательной железы, толстой кишки, прямой кишки и мочевого пузыря. Структура ткани солидных опухолей включает взаимозависимые отделы тканей, включая паренхиму (раковые клетки) и поддерживающие стромальные клетки, в которых диспергированы раковые клетки и которые могут обеспечивать поддерживающую среду. В некоторых вариантах осуществления рак выбран из рака шейки матки, рака головы и шеи (включая, например, плоскоклеточный рак головы и шеи [HNSCC]), глиобластомы, рака яичников, саркомы, рака поджелудочной железы, рака мочевого пузыря, рака молочной железы, тройного негативного рака молочной железы и немелкоклеточного рака легкого. Структура ткани солидных опухолей включает взаимозависимые отделы тканей, включая паренхиму (раковые клетки) и поддерживающие стромальные клетки, в которых диспергированы раковые клетки и которые могут обеспечивать поддерживающую среду.

Под «оттаянными криоконсервированными ТП» в настоящем документе подразумевается популяция ТП, которые ранее были криоконсервированы и затем обработаны для возвращения до комнатной или более высокой температуры, включая, но без ограничения, температуры культур клеток или температуры, при которых ТП могут вводиться пациенту.

Термины «лечение», «лечащий», «лечить» и т.п. относятся к получению желаемого фармакологического и/или физиологического эффекта. Эффект может быть профилактическим с точки зрения полного или частичного предотвращения заболевания или его симптома, и/или оно может быть терапевтическим с точки зрения частичного или полного излечения заболевания и/или неблагоприятного эффекта, связанного с заболеванием. «Лечение», как используется в настоящем документе, охватывает любое лечение заболевания у млекопитающего, в частности, человека, и включает: (а) предотвращение возникновения заболевания у субъекта, который может быть предрасположен к заболеванию, но еще не диагностирован как имеющий его; (b) замедление заболевания, т.е. остановку его развития или прогрессирования; и (с) облегчение заболевания, т.е. вызывание регрессии заболевания и/или ослабление

одного или нескольких симптомов заболевания. «Лечение» также означает доставку агента для обеспечения фармакологического эффекта даже в отсутствие заболевания или состояния. Например, «лечение» включает доставку композиции, которая может вызывать иммунную реакцию или обеспечивать иммунитет в отсутствие болезненного состояния, например, в случае вакцины.

Под «инфильтрирующими опухоль лимфоцитами» или «ТИЛ» в настоящем документе подразумевается популяция клеток, первоначально полученных как белые клетки крови, которые покинули кровоток субъекта и мигрировали в опухоль. ТИЛ включают, но без ограничения, цитотоксические $CD8^+$ Т-клетки (лимфоциты), $CD4^+$ Т-клетки $Th1$ and $Th17$, естественные клетки-киллеры, дендритные клетки и макрофаги $M1$. ТИЛ включают как первичные, так и вторичные ТИЛ. «Первичные ТИЛ» представляют собой такие, которые получены из образцов тканей пациента, как описано в настоящем документе (иногда называемые «свежесобранными»), а «вторичные ТИЛ» представляют собой любые популяции клеток ТИЛ, которые были размножены или пролиферировали, как описано в настоящем документе, включая, но без ограничения, объемные ТИЛ и размноженные ТИЛ («REP ТИЛ» или «post-REP ТИЛ»). Популяции клеток ТИЛ могут включать генетически модифицированные ТИЛ. Как правило, ТИЛ могут быть определены либо биохимически, используя маркеры клеточной поверхности, либо функционально, по их способности к инфильтрации опухолей и осуществлению лечения. В целом, ТИЛ можно классифицировать по экспрессии одного или нескольких из следующих биомаркеров: $CD4$, $CD8$, $TCR \alpha\beta$, $CD27$, $CD28$, $CD56$, $CCR7$, $CD45Ra$, $CD62L$, $CD95$, $PD-1$ и $CD25$. Дополнительно и альтернативно ТИЛ могут быть функционально определены по их способности к инфильтрации солидных опухолей при повторном введении пациенту. ТИЛ могут быть дополнительно охарактеризованы по активности, например, ТИЛ могут считаться активными или функциональными, если в ответ на взаимодействие с TCR они продуцируют, например, интерферон (IFN), высвобождение которого составляет больше чем примерно 50 пг/мл, больше чем примерно 100 пг/мл, больше чем примерно 150 пг/мл или больше чем примерно 200 пг/мл, или, более предпочтительно, индивидуальные клетки могут быть активными посредством внутриклеточного окрашивания на $CD137$, $CD107a$, $INF-\gamma$, $TNF-\alpha$ и $IL-2$ после индуцированной TCR стимуляции с помощью проточной цитометрии.

Используемый в настоящем документе термин «ретентат» относится к материалу, который не проходит через фильтр, сетку или мембрану.

Термин «максимальная полезность», используемый в настоящем документе, относится к изготовлению или непосредственному применению в регенеративных лекарственных средствах, адоптивных клеточных терапиях, АТМР, диагностических исследованиях *in vitro* или научных исследованиях.

Настоящее изобретение относится к опухоль-инфильтрирующим лимфоцитам (ТИЛ), в частности, к немодифицированным ТИЛС (УТИЛ), которые могут быть выделены из опухолей пациента с метастатическим раком, включая аутологичные ТИЛ, полученные от одного и того же онкологического пациента и возвращенные ему же. Настоящее изобретение также относится к способам выделения терапевтической популяции криоконсервированных ТИЛ или УТИЛ, а также к ТИЛ и УТИЛ, полученным или получаемым посредством использования устройства, включающего одноразовый асептический набор для обработки резецированной опухоли способами, описанными в настоящем документе.

Как правило, ТИЛ сначала получают из образца опухоли пациента («первичные ТИЛ»), а затем размножают до более крупной популяции для дальнейших манипуляций, как описано в настоящем документе, криоконсервируют, повторно стимулируют, как описано в настоящем документе, и необязательно оценивают на фенотип и метаболические параметры в качестве показателя здоровья ТИЛ.

Образец опухоли пациента может быть получен с использованием способов, известных в данной области, как правило, посредством хирургической резекции, пункционной биопсии или других способов получения образца, который содержит смесь опухолевых и ТИЛ-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, полученную из гематологической злокачественной опухоли. Салидная опухоль может относиться к любому типу рака, включая, но без ограничения, рак молочной железы, яичников, шейки матки, поджелудочной железы, предстательной железы, колоректальный рак, рак легких, головного мозга, почек, желудка и кожи (включая, но без ограничения, плоскоклеточную карциному, базально-клеточную карциному и меланому). В некоторых вариантах осуществления ТИЛ получают из злокачественных опухолей меланомы, поскольку сообщалось, что они имеют особенно высокие уровни ТИЛ.

Получение в целом включает двухстадийный процесс. На стадии 1 исходный опухолевой материал рассекают, помещают в асептический набор, имеющий модуль

дезагрегации, ферментативно расщепляют и/или фрагментируют, и гомогенизируют опухоль в модуле дезагрегации с получением суспензии из отдельных клеток. При этом гомогенизированные клетки могут быть дополнительно очищены в асептическом наборе в отдельном модуле обогащения для удаления компонентов, таких как реагенты, которые больше не требуются; клеточный мусор; незагрехиванная ткань, и клетки могут быть непосредственно криоконсервированы для стабилизации исходного материала для изготовления ТП и хранения в модуле стабилизации асептического набора до тех пор, пока не потребуется стадия 2. Стадия 2 обычно включает выращивание ТП из исходного материала резецированной опухоли (2 недели), за которым следует процесс быстрого размножения клеток ТП (протокол быстрого размножения «REP» - 2 недели). Конечный продукт промывают и собирают перед суспендированием в забуференном растворе, содержащем 8,5% HAS и 10% DMSO, и криоконсервируют с образованием твердого асептического продукта, который оттаивают перед инфузией в виде разовой дозы без дополнительной модификации.

Существуют три отдельных элемента для лечения, которые потенциально способствуют терапевтической активности. Основным элементом являются ТП, т.е. Т-клетки, происходящие из опухоли, которые могут нацеливаться и уничтожать опухолевые клетки различными способами, используемыми Т-клетками как часть их нормальной функции. Эти способы включают прямые способы (т.е. перфорин-опосредованная цитотоксичность) и непрямые способы (т.е. продукция цитокинов). Какой из этих способов является наиболее важным для противоопухолевых эффектов *in vivo*, неясно, хотя модели на мышах предполагают, что продукция гамма-интерферона имеет решающее значение для эффективной терапии. Двумя другими элементами, которые вносят свой вклад в терапию, являются кондиционирующая химиотерапия и внутривенное введение высоких доз интерлейкина-2. Считается, что эти два элемента действуют, поддерживая приживание Т-клеток у пациента после инфузии: первоначально посредством кондиционирующей химиотерапии, которая удаляет конкурирующие и регулирующие иммунные клетки; за которым следует компонент ИЛ-2, который поддерживает выживание Т-клеток.

Структуру продукта клеточной терапии создают путем выращивания ТП непосредственно из расщепленной ферментом опухолевой массы с помощью поддерживающей рост среды для культивирования клеток и поддерживающего Т-клетки фактора роста интерлейкина-2 (ИЛ-2). Это позволяет опухолеспецифическим Т-

клеткам избирательно выживать и расти из смеси опухолевых клеток, в то время как Т-клетки, которые не распознают опухолевые антигены, не будут стимулироваться и будут избирательно потеряны. Продукт представляет собой продукт на основе аутологичных Т-клеток, при этом Т-клетки были получены из собственной раковой ткани пациента и быстро размножились с образованием чистой популяции Т-клеток и Т-клеток, определяемых поверхностным маркером CD3.

Вкратце, ТП, в частности УТП, могут быть получены в двухстадийном процессе с использованием биопсии опухоли в качестве исходного материала: стадия 1 (обычно выполняется в течение 2-3 часов) включает первоначальный сбор и обработку опухолевого материала путем рассечения, ферментативного расщепления и гомогенизации с использованием набора и полуавтоматизированного устройства для получения суспензии отдельных клеток, которая может быть напрямую криоконсервирована с использованием модуля стабилизации набора для стабилизации исходного материала для последующего изготовления, и стадия 2, которая может быть осуществлена через несколько дней или спустя несколько лет. Стадия 2 может выполняться в течение 4 недель и может представлять собой непрерывный процесс, который начинается с оттаивания продукта, полученного на стадии 1, и выращивания ТП из исходного материала опухоли (примерно 2 недели), после чего следует процесс быстрого размножения клеток ТП (примерно 2 недели) для увеличения количества клеток и, следовательно, дозы. ТП, в частности УТП, концентрируют и промывают перед составлением в виде жидкой суспензии клеток. Асептический лекарственный продукт может быть подвергнут криоконсервации в пакете, который будет разморожен перед внутривенной инфузией в виде однократной дозы без каких-либо дополнительных модификаций.

В одном варианте осуществления пакет по изобретению представляет собой пакет для сбора и/или пакет для криоконсервации. Пакеты и любые связанные с ними трубки могут быть, как правило, прозрачными, полупрозрачными, любого желаемого цвета или их комбинацией. Пакеты для сбора ткани и/или трубки могут быть, как правило, изготовлены способами, аналогичными изготовлению закрытых и/или запечатанных пакетов для крови и/или криоконсервации и связанных с ними трубок. Трубка по изобретению может быть изготовлена из любого желаемого материала, включая, но без ограничения, поливинилхлорид (PVC). Например, PVC может быть желательным материалом, поскольку PVC лучше всего подходит для сварки и/или запечатывания.

Пакет для сбора, такой как пакет для сбора ткани по изобретению, может включать по меньшей мере часть пакета для приема ткани, изготовленного из предварительно определенного материала, такого как полиолефиновый полимер, этиленвинилацетат (EVA), сополимеры, такие как смесь винилацетатного и полиолефинового полимера (например, пленка OriGen Biomedical EVO) и/или материал, включающий EVA. Материалы для использования в пакете могут быть выбраны по определенному свойству и/или набору свойств, например, пригодности для герметизации, такой как термосвариваемость, газопроницаемость, гибкость, например, гибкость при низких температурах, эластичность, например, эластичность при низких температурах, химическая стойкость, оптическая прозрачность, биосовместимость, такая как цитотоксичность, гемолитическая активность, устойчивость к выщелачиванию, низкое содержание твердых частиц.

Сварные швы могут быть образованы во время использования энергии, например, тепла, для создания зоны сварки. Сварные швы, образованные во время использования, могут иметь ширину в диапазоне от примерно 2,5 мм до примерно 7,5 мм. Как правило, шов 140 формируется после помещения тканевого материала в пакет 140 и может иметь ширину примерно 5 мм. Сварные швы могут быть испытаны на прочность с использованием испытания на расслаивание сварного шва (например, ASTM F88/F88M) и/или испытания на разрыв (например, ASTM F1140/F1140M или ASTM F2051/F2054M).

В некоторых вариантах осуществления пакет или гибкий контейнер может выдерживать силу в 100 ньютонов во время использования, если он должным образом запечатан и дополнительно закреплен зажимом при размещении внутри устройства для лечения и/или обработки. Вариант осуществления пакета или гибкого контейнера может быть сконструирован таким образом, чтобы выдерживать силу в 75 ньютонов во время использования, если он должным образом запечатан и дополнительно закреплен зажимом при размещении внутри устройства для лечения и/или обработки.

При формировании герметичных соединений или сварных швов на гибком контейнере, таком как пакет, например, пакет для сбора и/или пакет для криоконсервации, может быть использовано запечатывающее устройство для подачи тепла и/или давления при предварительно определенной температуре, давлении и количестве времени в зависимости от материала, используемого в пакете. Например, для некоторых термосварочных аппаратов может потребоваться применение тепла и

давления в течение примерно восьми секунд. Через 8 секунд нагрев устройства может быть отключен, однако еще на 2-3 секунды может быть приложено давление.

В некоторых вариантах осуществления пакеты могут иметь длину в диапазоне от примерно 10 см до примерно 50 см. В частности, пакеты для использования в описанном в настоящем документе изобретении могут иметь длину в диапазоне от примерно 15 см до примерно 30 см. Например, пакеты могут иметь длину в диапазоне от примерно 18 см до примерно 22 см.

Некоторые трубки могут быть свариваемыми. Свариваемые трубки могут быть изготовлены из полимерного материала, например, поливинилхлорида (PVC).

Клапаны, включая, но без ограничения, безыгольные клапаны, могут быть использованы в точках вдоль трубопровода. В некоторых вариантах осуществления пакеты могут иметь длину в диапазоне от примерно 10 см до примерно 40 см. В частности, пакеты для использования в описанном в настоящем документе изобретении могут иметь длину в диапазоне от примерно 15 см до примерно 30 см. Например, пакеты могут иметь длину в диапазоне от примерно 18 см до примерно 22 см.

Пакеты для криоконсервации могут быть пригодны для криоконсервации с помощью криопротектора, такого как диметилсульфоксид («DMSO»). В некоторых вариантах осуществления пакеты для криоконсервации могут быть сконструированы таким образом, чтобы пакеты могли вмещать объем материала в диапазоне от примерно 5 мл до примерно 45 мл. В частности, пакет для криоконсервации может вмещать объем материала в диапазоне от примерно 10 мл до примерно 35 мл. Например, некоторые варианты осуществления включают пакеты для криоконсервации, которые могут вмещать объем материала, подлежащего хранению, в диапазоне от примерно 15 мл до примерно 30 мл. Размер пакета для криоконсервации может быть таким, чтобы был достигнут желаемый предварительно определенный объем. В некоторых вариантах осуществления пакет для криоконсервации может иметь ширину в диапазоне от примерно 4 см до примерно 11 см и длину в диапазоне от примерно 10 см до примерно 18 см. Например, пакет для криоконсервации может иметь ширину в диапазоне от примерно 5,8 см до примерно 9,8 см и длину в диапазоне от примерно 12 см до примерно 16 см. В частности, вариант осуществления пакета для криоконсервации может иметь ширину примерно 7,8 см и длину примерно 14 см.

Перед применением набор для криоконсервации и/или его определенные компоненты могут быть стерилизованы. Материалы, используемые для изготовления

пакетов, могут быть термосвариваемыми. Материалы для использования в пакетах могут включать, но без ограничения, полимеры, такие как EVA, полиамиды (например, нейлон) и их комбинации. Открытые пакеты могут быть использованы для процессинга и/или дезагрегации после закрытия пакета с помощью герметичного соединения и/или зажима.

Фильтр может представлять собой встроенный фильтр, фильтр для крови, такой как фильтр для введения крови, биологический фильтр и/или встроенный фильтр для удаления комков. Фильтр может быть выполнен с возможностью удаления материалов из обрабатываемой ткани сверх заданного размера для формирования желаемого материала. Например, комки ткани могут быть отделены от дезагрегированной ткани с помощью фильтра. В частности, тканевая композиция, поступающая в трубку после фильтрации, может содержать компоненты, имеющие средний размер менее чем примерно 200 мкм, так что образуется желаемый материал. Например, желаемый материал может включать ТП (инфильтрирующие опухоль лимфоциты), имеющие средний размер менее примерно 170 мкм.

Фильтр может быть выбран таким образом, чтобы обрабатываемая композиция ткани, поступающая из трубки, могла быть обогащена таким образом, что после фильтра желаемый материал течет в трубку в направлении стабилизирующего элемента, содержащего компоненты, имеющие размер в диапазоне примерно от 15 мкм до примерно 500 мкм. В некоторых вариантах осуществления фильтр может быть выполнен таким образом, что тканевая композиция, поступающая в трубку в направлении стабилизирующего элемента после фильтрации, имеет компоненты, имеющие размер в диапазоне от примерно 50 мкм до примерно 300 мкм. Например, в одном варианте осуществления фильтр может быть выполнен таким образом, что тканевая композиция, поступающая в трубку после фильтрации, имеет компоненты, имеющие размер в диапазоне от примерно 150 мкм до примерно 200 мкм.

В некоторых вариантах осуществления фильтр элемента обогащения может удалять материалы из обрабатываемой ткани, выходящие за пределы заданного диапазона размеров от примерно 5 мкм до примерно 200 мкм, с образованием желаемого материала. Например, желаемый материал может включать ТП, имеющие средний размер в диапазоне от примерно 5 мкм до примерно 200 мкм. Коннекторы могут быть размещены на заданном расстоянии от пакета для сбора. Например, безыгольный клапан может располагаться примерно в 20 см от пакета для сбора. Коннекторы, такие как безыгольные клапаны, могут быть использованы для внесения

материалов в пакет для сбора. Например, ферментная среда может быть помещена в безыгольный клапан, чтобы добавить среду в пакет для сбора. Материалы, подаваемые через клапаны, включают, например, среду для расщепления опухоли и/или криопротектор или среду для криоконсервации, такую как DMSO и/или его растворы, такие как среда для криоконсервации, содержащая 55% DMSO и 5% декстрана (например, BloodStor 55-5).

Шприцы могут быть использованы для подачи среды для расщепления опухоли и 55% раствора DMSO, такого как среда для криоконсервации, содержащая 55% DMSO и 5% декстрана, соответственно, через безыгольные клапаны 290, 292. Во время обработки материалы могут выборочно подаваться в набор для криоконсервации в заранее установленное время. Кроме того, зажимы можно использовать для контроля потока поступающих материалов, таких как среда для расщепления опухоли, и/или криопротектор, такой как раствор DMSO, может подаваться в устройства, такие как пакет для сбора, фильтр и/или пакет для криоконсервации, в заранее установленное время.

В некоторых вариантах осуществления после такого коннектора может иметься заданное количество трубок, чтобы оставить место для приваривания дополнительных компонентов набора для криоконсервации. Например, после некоторых коннекторов перед следующим элементом может быть расположено по меньшей мере десять (10) см трубки. Трубка 199 может быть герметизируемой и/или свариваемой. Например, материалы для трубок могут включать, помимо прочего, PVC (поливинилхлорид) и/или другие материалы, известные в данной области. В некоторых вариантах осуществления размеры трубок могут подходить к коннекторам. Например, трубка может иметь внутренний диаметр в диапазоне от примерно 1,5 мм до примерно 4,5 мм и внешний диаметр в диапазоне от примерно 2,1 мм до примерно 6,1 мм. Например, вариант осуществления набора для криоконсервации может включать трубку, имеющую внутренний диаметр в диапазоне от примерно 2,9 мм до примерно 3,1 мм и внешний диаметр в диапазоне от примерно 4,0 мм до примерно 4,2 мм. Трубки, используемые в наборе 191 для криоконсервации, могут различаться по длине, при этом отдельные элементы трубок имеют длину в диапазоне от примерно 1 см до примерно 30 см.

Зажимы можно использовать для препятствия и/или предотвращения перемещения ферментационной среды и/или расщепленной ткани в фильтр. Например, зажим можно использовать для препятствия и/или предотвращения перемещения ферментационной среды и/или расщепленной ткани в фильтр перед желаемой стадией

фильтрации. Другой зажим 198 препятствует и/или предотвращает нежелательное перемещение криозащитного агента в фильтр.

Два или более пакетов могут быть соединены вместе, чтобы обеспечить надлежащее хранение дезагрегированного материала продукта в конкретном варианте осуществления.

В некоторых вариантах осуществления изобретение может включать автоматизированное устройство для полуавтоматизированной асептической дезагрегации, обогащения и/или стабилизации клеток и/или клеточных агрегатов из ткани, например, солидной ткани млекопитающего. Автоматизированное устройство для использования с изобретением может включать программируемый процессор и набор для криоконсервации. В некоторых вариантах осуществления набор для криоконсервации может быть одноразовым. Изобретение также относится к полуавтоматизированному способу асептической обработки ткани.

В некоторых вариантах осуществления в наборе для сбора могут быть использованы пакеты, такие как пакет для сбора. Пакеты имеют открытый конец, позволяющий вносить образец, например, образец ткани. Коннектор может соединять пакет с трубкой в наборе для сбора. Материал трубки может быть герметизируемым и/или свариваемым. Например, трубка может быть герметизирована с использованием энергии, такой как тепло, радиочастота и т.д. Материал трубки может быть изготовлен из PVA.

В некоторых вариантах осуществления трубка может быть соединена с клапаном для обеспечения возможности добавления одного или нескольких ферментных растворов, включая, но без ограничения, коллагеназу, трипсин, липазу, гиалуронидазу, дезоксирибонуклеазу, либеразу III, пепсин или их смеси. Например, клапан может представлять собой безыгольный клапан. Трубка, используемая в наборе для криоконсервации, может включать трубку, имеющую внешний диаметр в диапазоне от примерно 3,0 мм до примерно 5,0 мм с внутренним диаметром трубки в диапазоне от примерно 2,0 мм до примерно 4 мм. В частности, трубка может иметь внешний диаметр $4,1 \pm 0,1$ мм и внутренний диаметр примерно $3,0 \pm 0,1$ мм. Длина трубки может зависеть от конфигурации комплекта для сбора. Например, вариант осуществления набора для сбора может включать трубку длиной от примерно 10 см до примерно 20 см.

В некоторых вариантах осуществления прототип набора для сбора может включать один или несколько зажимов для препятствия и/или предотвращения

перемещения ткани и/или ферментационной среды. В частности, можно препятствовать перемещению в фильтр ферментационной среды и/или ткани перед стадией фильтрации.

Существуют три отдельных элемента лечения, которые потенциально могут способствовать терапевтической активности. Основными элементами являются ТП, такие как УТП, которые потенциально могут уничтожать опухолевые клетки с помощью различных механизмов, используемых Т-клетками как часть их нормальной функции.

Эти механизмы включают: прямую цитотоксичность за счет [a] высвобождения цитотоксинов (например, перфорина, гранзимов и гранулизина), которые проникают в клетки-мишени при тесном взаимодействии и вызывают гибель клеток; и посредством [b] взаимодействий на клеточной поверхности между Т-клеткой и мишенью, таких как опосредованный связыванием лиганда FAS апоптоз, цитотоксичность; и непрямые методы (например, продукция цитокинов), которые способны рекрутировать и стимулировать вторичные эффекторные клетки, чтобы задействовать и индуцировать гибель опухолевых клеток.

ТП, в частности УТП, представляют собой аутологичный продукт; следовательно, каждая изготовленная партия обеспечивает одну дозу для определенного пациента. Не существует подпартий или объединения партий. Лекарственный продукт представляет собой небольшую асептически подготовленную партию Т-клеток (от 5×10^9 до 5×10^{10}), криоконсервированных в солевом растворе с 8,5% сывороточным альбумином человека и 10% DMSO объемом 125-270 мл для однократной внутривенной инфузии после оттаивания.

Настоящее изобретение имеет несколько преимуществ по сравнению с патентом США № 10398734 («патент '734»). Первой стадией в патенте '734 является преобразование опухолевой массы во фрагменты, из которых культивируются ТП. Напротив, в настоящем изобретении высвобождение ТП происходит из опухоли, которая была сохранена и дезагрегирована в асептических условиях после резекции в асептическом наборе, из которой готовили клеточную суспензию и криоконсервировали полученные ТП путем замораживания. Настоящее изобретение предлагает разнообразную популяцию ТП, представляющую разнообразие, существующее внутри опухоли. И поскольку они представляют собой гомогенную суспензию, ТП, которые размножаются в культуре, будут сохранять это разнообразие,

что дает наилучшие шансы воздействовать на разнообразную популяцию раковых клеток, находящихся в опухоли.

Напротив, процесс изготовления согласно патенту '734 начинается с фрагментов ткани, в которых уже произошло ухудшение внутренней клеточной популяции во время транспортировки и любой дальнейшей задержки перед началом обработки. Кроме того, ТП, используемые для изготовления, будут представлять собой только ТП, которые размножаются из фрагментов ткани, а не ТП, которые сохраняются внутри, так что полученная клеточная популяция может не отражать полное разнообразие окружения опухоли.

Другое отличие заключается в том, что в процессе по настоящему изобретению вступление в закрытую производственную обработку происходит намного раньше и с меньшей вероятностью загрязнения, чем в процессе по патенту '734. В частности, разрушение опухолевой ткани происходит в закрытой системе обработки в настоящей заявке, а не в обширном процессе фрагментации, который описан в патенте '734 как происходящий при открытой операции в боксе биологической безопасности.

Поскольку исходный материал для настоящего изобретения хранится в асептических условиях в асептическом наборе, весь производственный процесс, который можно проводить с криоконсервированной суспензией опухолевых клеток, можно планировать и проводить с высокой производительностью и эффективностью. Напротив, поскольку патент '734 начинается с незамороженной ткани, стадии фрагментации и «вырастания» выполняются в режиме ожидания с более низкой эффективностью использования производственных мощностей. Удаление этой промежуточной стадии замораживания в патенте '734 сокращает производственный процесс в целом, но означает, что весь процесс выполняется в режиме ожидания, а это означает, что время простоя производства имеет серьезные последствия для производственных мощностей согласно патенту '734, поскольку не может быть никаких задержек, и планирование периода простоя для производства требует, чтобы все продукты в процессе производства были завершены, а новые операции были остановлены.

Преимущество способа по настоящей заявке состоит в том, что ткань в форме резецированной опухоли может быть собрана до возникновения потребности в ТП-терапии, транспортирована, обработана, криоконсервирована и сохранена в асептическом наборе до тех пор, пока не возникнет потребность в изготовлении, поэтому у пациентов с более ранней стадией заболевания может быть взят образец и

храниться, пока они подвергаются альтернативным методам лечения. Следовательно, имеется незначительное или отсутствие влияния на время или географическое положение места сбора опухоли и последующего изготовления. В то время как в патенте '734 это невозможно, и полное изготовление лекарственного препарата должно происходить до замораживания и хранения клеток.

Как упоминалось выше, это очень разные процессы культивирования, которые будут генерировать разные популяции клеток, из которых можно инициировать культуру REP, что отражено в очень разных количествах клеток, необходимых для посева культуры REP, 1-20 миллионов (настоящее изобретение) против 25-200 миллионов (патент '734). В настоящем изобретении во время начального размножения ТП при посеве культуры используется клеточная суспензия (т.е. клетки, которые вырастают из дезагрегированных и криоконсервированных клеток, которые будут представлять собой смесь резидентных и эмерджентных Т-клеток), а не рост из фрагментов (т.е. эмерджентных клеток); это означает, что REP не просто засеян эмерджентными Т-клетками. Кроме того, в настоящем изобретении могут использоваться как твердые, так и гибкие закрытые контейнеры, где гибкие контейнеры обеспечивают более оптимальную среду в зависимости от количества полученной суспензии опухоли, а не количества фрагментов, как определено в патенте '734].

Материал метастатической опухоли удаляют хирургическим путем с использованием стандартной хирургической практики в хирургической операционной. Перед дезагрегацией удаляют посторонний материал (т.е. неопухолевой материал, определяемый макроскопически), и опухолевой материал переносят в стерильный пакет.

Следующее может быть включено в приемочное тестирование исходного материала опухоли. Во-первых, подтверждается, что исходная ткань является опухолевым материалом. Во-вторых, репрезентативный образец дезагрегированной ткани оценивается на предмет микробной нагрузки и, при наличии, определяется чувствительность к антибиотикам (изготовление может осуществляться при наличии риска с использованием антибиотиков), но конечный материал должен быть отрицательным на микробный рост. В-третьих, количество и жизнеспособность ТП и опухолевых клеток можно оценить с помощью проточной цитометрии.

Способы по настоящему изобретению включают стадию асептической дезагрегации опухоли, резецированной у субъекта, тем самым получая

дезагрегированную опухоль, где резецированная опухоль является достаточно дезагрегированной, если ее можно криоконсервировать без повреждения клеток. В предпочтительном варианте осуществления программируемый процессор полуавтоматизированного устройства может управлять дезагрегацией, позволяя поверхностям внутри гибких контейнеров для дезагрегации механически раздавливать и срезать солидную ткань (см., например, публикацию РСТ № WO 2018/130845). Поверхности дезагрегации могут контролироваться, например, механическими поршнями.

Для ферментативного расщепления клеточную суспензию (содержащую как Т-клетки, так и опухолевые клетки) получают из резецированной метастатической опухоли с использованием ферментной смеси ДНКазы 1 и коллагеназы (тип IV). Комбинация многократного механического сжатия открывает дополнительные поверхности для доступа ферментов, а ферментативная реакция ускоряет процесс превращения солидной ткани в клеточную суспензию перед необязательным криоконсервированием. В одном варианте осуществления после завершения стадии дезагрегации криопротектор на основе DMSO добавляют непосредственно перед циклом замораживания с контролируемой скоростью. В некоторых вариантах осуществления ферментативное расщепление солидной ткани может осуществляться путем выбора и обеспечения одного или нескольких растворов ферментов среды, таких как коллагеназа, трипсин, липаза, гиалуронидаза, дезоксирибонуклеаза, либеразы H1, пепсин или любая их смесь. Ферментативное расщепление резецированной метастатической опухоли может происходить в гибких контейнерах для дезагрегации полуавтоматизированного устройства.

В качестве примера, в другом варианте осуществления способа по изобретению, в котором процесс дезагрегации дополнен ферментативным расщеплением, состав среды для ферментативного расщепления должен быть дополнен ферментами, которые способствуют расщеплению белка, вызывающего разрушение межклеточных границ.

Различные жидкие составы, известные в области культивирования клеток или обращения с клетками, могут быть использованы в качестве жидкого состава, используемого для дезагрегации клеток и ферментативного расщепления солидных тканей, включая, но без ограничения, одну или несколько из следующих сред, включающих растворы для консервации органов, растворы для селективного лизиса, PBS, DMEM, HBSS, DPBS, RPMI, среду Искова, XVIVO™, AIM-V™, раствор Рингера с лактатом, ацетат Рингера, физиологический раствор, раствор PLASMALYTE™,

кристаллоидные растворы и растворы для внутривенного введения, коллоидные растворы и растворы для внутривенного введения, пятипроцентную декстрозу в воде (D5W), раствор Хартмана, DMEM, HBSS, DPBS, RPMI, AIM-V™, среду Iscove, XVIVO™, каждые из которых могут быть необязательно дополнены дополнительными факторами поддержки клеток, например, фетальной телячьей сывороткой, человеческой сывороткой или заменителями сыворотки или другими питательными веществами или цитокинами, чтобы способствовать восстановлению и выживанию клеток или специфическому истощению клеток. Среда может представлять собой стандартную клеточную среду, такую как упомянутая выше среда, или специальную среду, например, для первичной культуры клеток человека (например, для клеток эндотелия, гепатоцитов или кератиноцитов) или стволовых клеток (например, для созревания дендритных клеток, гемопоэтической экспансии, кератиноцитов, мезенхимальных стволовых клеток или Т-клеток). Среда может содержать добавки или реагенты, хорошо известные в данной области, например, альбумины и транспортные белки, аминокислоты и витамины, ионы металлов, антибиотики, факторы прикрепления, факторы открепления, поверхностно-активные вещества, факторы роста и цитокины, гормоны или солубилизирующие агенты. В продаже имеются различные среды, например, от ThermoFisher, Lonza или Sigma-Aldrich или аналогичных производителей и поставщиков сред.

Жидкий состав, необходимый для ферментативного расщепления, должен иметь достаточное количество ионов кальция, присутствующих в концентрации по меньшей мере от 0,1 мМ до 50 мМ с оптимальным диапазоном от 2 до 7 мМ, в идеальном случае 5 мМ.

Солидная ткань, подлежащая расщеплению, может быть промыта после дезагрегации жидким составом, содержащим хелатирующие агенты EGTA и EDTA, для удаления факторов адгезии и ингибирующих белков перед промывкой и удалением EGTA и EDTA перед ферментативным расщеплением.

Жидкий состав, необходимый для ферментативного расщепления, является более оптимальным с минимальным количеством хелатирующих агентов EGTA и EDTA, которые могут сильно ингибировать активность фермента путем удаления ионов кальция, необходимых для стабильности и активности фермента. Кроме того, другими известными ингибирующими веществами являются β-меркаптоэтанол, цистеин и 8-гидроксихинолин-5-сульфонат.

Обработка опухолевого материала с использованием рассечения, ферментативного расщепления и гомогенизации приводит к получению суспензии отдельных клеток ТП, в частности УТП, которая может быть непосредственно криоконсервирована для стабилизации исходного материала для последующей обработки посредством первого размножения клеточной суспензии ТП, в частности, УТП, в П-2 с получением первой популяции ТП, в частности, УТП.

Способы также включают стадию криоконсервации дезагрегированной опухоли, например, клеточной суспензии. Криоконсервацию дезагрегированной опухоли проводят в тот же день, что и стадию асептической дезагрегации опухоли, резецированной у субъекта, тем самым получая дезагрегированную опухоль, при этом резецированная опухоль является достаточно дезагрегированной, если ее можно криоконсервировать без повреждения клеток. Например, криоконсервацию проводят через 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 или 90 минут, или 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, или 22 часа после стадии дезагрегации опухоли. Криоконсервацию дезагрегированной опухоли, как суспензию отдельных клеток, полученную в результате ферментативной дезагрегации в модуле дезагрегации полуавтоматизированного устройства, осуществляют путем охлаждения и/или выдерживания суспензии при температуре от 8°C до по меньшей мере -80°C или ниже. Дезагрегация может занять всего 5 минут, но чаще всего от 45 минут до 1 часа, а криоконсервация может занять от 60 до 150 минут. В одном варианте осуществления способы включают хранение криоконсервированной дезагрегированной опухоли. Как описано в предпочтительных вариантах осуществления, устройство содержит по меньшей мере один контейнер для клеток для криоконсервации, при этом контейнеры представляют собой гибкий контейнер, изготовленный из упругого деформируемого материала. В этом варианте осуществления устройства конечный контейнер либо переносится непосредственно в морозильную камеру от -20 до -190°C, либо более оптимально размещается в устройстве для замораживания с регулируемой скоростью, либо связанном с устройством, либо поставляемым отдельно (производимым, например, Planer Products или Asymptote Ltd), в котором температура морозильной камеры и гибкого контейнера(ов) для хранения, используемых для хранения контейнера с обогащенной дезагрегированной твердой тканью, регулируется либо путем: введения холодного газа (обычно азота, например, продуктов Planer); или путем отвода тепла от контролируемой охлаждающей поверхности(ей). Оба способа позволяют осуществлять точный контроль с погрешностью менее 1°C или более предпочтительно 0,1°C

процесса замораживания с требуемой скоростью для замораживания конкретной клетки (клеток) на основе раствора для замораживания и желаемой жизнеспособности продукта. Этот процесс криоконсервации должен учитывать температуру формирования микросталлов льда, которая в идеальном случае должна быть как можно ближе к температуре плавления замораживающего раствора. После роста кристаллов в водном растворе воду удаляли из системы в виде льда, и концентрация остаточного незамороженного раствора увеличивалась. По мере снижения температуры образуется больше льда, уменьшая остаточную незамороженную фракцию, концентрация которой еще больше увеличивается. В водных растворах существует большой диапазон температур, в котором лед сосуществует с концентрированным водным раствором. В конце концов, за счет снижения температуры раствор достигает состояния стеклования, после чего замороженный раствор и клетки переходят из вязкого раствора в твердое состояние. Ниже этой температуры клетки не могут подвергаться дальнейшим биологическим изменениям и, следовательно, стабилизируются на годы или десятилетия, пока не потребуются.

Формирование кристаллов льда и рост кристаллов включает выделение тепла замораживаемому раствору и клеточному микроокружению, и желательно поддерживать охлаждение клеток и замораживающий раствор, даже если замораживающая жидкость устойчива к изменениям температуры во время фазового перехода. В зависимости от того, включает ли дезагрегация ферментативную дезагрегацию и какова оптимальная температура ферментативного расщепления для данного фермента, концентрация фермента и тип ткани, температуры в начале криоконсервации включают, без ограничения, 40°C, 39°C, 38°C, 37°C, 36°C, 35°C, 34°C, 33°C, 32°C, 31°C, 30°C, 29°C, 28°C, 27°C, 26°C, 25°C, 24°C, 23°C, 22°C, 21°C и 20°C, т.е. температуры в диапазоне от температуры тела млекопитающего до комнатной температуры, и дополнительно включают более низкие температуры охлаждения, такие как, без ограничения, 10°C, 8°C, 6°C, 5°C, 4°C, 3°C и 2°C. Целевые температуры для криогенного охлаждения включают, без ограничения, -60°C, -65°C, -70°C, -75°C, -80°C, -85°C, -90°C, и температуры между ними, а также более низкие температуры вплоть до температуры хранения паров жидкого азота (-195,79°C). В некоторых вариантах осуществления способы и устройства, используемые в соответствии с изобретением, разработаны или запрограммированы так, чтобы свести к минимуму время от физиологической температуры или температуры расщепления до температуры криогенного хранения. В некоторых вариантах осуществления способы и

устройства, используемые в соответствии с изобретением для криоконсервации, предпочтительно разработаны и запрограммированы для охлаждения в условиях, посредством которых выделение тепла в, внутрь, вокруг или в окружающую среду, включая клетки, по мере кристаллизации среды сведено к минимуму или исключено. В некоторых вариантах осуществления разработаны способы и/или устройства, запрограммированные для непрерывного охлаждения от температуры дезагрегации до заданной криогенной температуры. Иллюстративные запрограммированные скорости охлаждения включают, без ограничения, $-0,5^{\circ}\text{C}/\text{мин}$, $-1^{\circ}\text{C}/\text{мин}$, $-1,5^{\circ}\text{C}/\text{мин}$, $-2^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ или $-2,5^{\circ}\text{C}/\text{мин}$. Скорость охлаждения является целью программы и может меняться в зависимости от цикла охлаждения. Скорость охлаждения может варьироваться, например, на $\pm 0,1^{\circ}\text{C}/\text{мин}$, $\pm 0,2^{\circ}\text{C}/\text{мин}$, $\pm 0,3^{\circ}\text{C}/\text{мин}$, $\pm 0,4^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ или $\pm 0,5^{\circ}\text{C}/\text{мин}$. В одном варианте осуществления изобретения температура криоконсервации составляет $-80^{\circ}\text{C} \pm 10^{\circ}\text{C}$, и устройство запрограммировано на снижение температуры на $1^{\circ}\text{C}/\text{мин}$, или $1,5^{\circ}\text{C}/\text{мин}$, или $2^{\circ}\text{C}/\text{мин}$, или $1^{\circ}\text{C}/\text{мин} \pm 0,5^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ или $1,5^{\circ}\text{C}/\text{мин} \pm 0,5^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ или $2^{\circ}\text{C}/\text{мин} \pm 0,5^{\circ}\text{C}/\text{мин}$.

В некоторых вариантах осуществления предлагаемые способы обеспечивают получение молодых ТП, которые способны к увеличению циклов репликации при введении субъекту/пациенту и, как таковые, могут обеспечивать дополнительные терапевтические преимущества по сравнению со старыми ТП (т.е. ТП, которые дополнительно подвергаются раундам репликации перед введением субъекту/пациенту). Особенности молодых ТП описаны в литературе, например, в Donia, et al., *Scandinavian Journal of Immunology*, 75:157-167 (2012); Dudley et al., *Clin Cancer Res*, 16:6122-6131 (2010); Huang et al., *J Immunother*, 28(3):258-267 (2005); Besser et al., *Clin Cancer Res*, 19(17):OF1-OF9 (2013); Besser et al., *J Immunother* 32:415-423 (2009); Robbins, et al., *J Immunol* 2004; 173:7125-7130; Shen et al., *J Immunother*, 30:123-129 (2007); Zhou, et al., *J Immunother*, 28:53-62 (2005); и Tran, et al., *J Immunother*, 31:742-751 (2008), все из которых полностью включены в настоящее описание посредством ссылки.

Разнообразные антигенные рецепторы Т- и В-лимфоцитов продуцируются путем соматической рекомбинации ограниченного, но большого количества генных сегментов. Эти генные сегменты: V (вариабельный), D (разнообразный), J (соединительный) и C (константный) определяют специфичность связывания и последующие применения иммуноглобулинов и Т-клеточных рецепторов (TCR). Настоящее изобретение относится к способу создания ТП, которые демонстрируют и

увеличивают разнообразие репертуара Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления ТП, полученные настоящим способом, демонстрируют увеличение разнообразия репертуара Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления ТП, полученные с помощью предлагаемого способа, демонстрируют увеличение разнообразия репертуара Т-клеток по сравнению со свежесобранными ТП и/или ТП, полученными с использованием других способов, отличных от тех, которые предлагаются. В некоторых вариантах осуществления ТП, полученные с помощью предлагаемого способа, демонстрируют увеличение разнообразия репертуара Т-клеток по сравнению со свежесобранными ТП и/или ТП. В некоторых вариантах осуществления ТП, полученные при первом размножении, 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 иммуноглобулина находится в тяжелой цепи иммуноглобулина. В некоторых вариантах осуществления разнообразие иммуноглобулина находится в легкой цепи иммуноглобулина. В некоторых вариантах осуществления разнообразие находится в Т-клеточном рецепторе. В некоторых вариантах осуществления разнообразие присутствует в одном из Т-клеточных рецепторов, выбранных из группы, состоящей из альфа-, бета-, гамма- и дельта-рецепторов. 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. TCR α/β).

Способы по изобретению также включают стадию выполнения первого размножения путем культивирования дезагрегированной опухоли в среде для культивирования клеток, содержащей ИЛ-2, с получением первой популяции ТП, в частности, УТИЛ. Клетки, полученные в результате описанных выше стадий, культивируют в сыворотке, содержащей ИЛ-2, в условиях, благоприятствующих росту ТП по сравнению с опухолевыми и другими клетками. В некоторых вариантах осуществления гидролизат опухоли инкубируют в лунках объемом 2 мл в среде, содержащей инактивированную сыворотку АВ человека с 6000 МЕ/мл ИЛ-2. Эту первичную клеточную популяцию культивируют в течение периода, составляющего

нескольких дней, как правило, от 3 до 14 дней, в результате чего получают общую популяцию ТП, как правило, примерно 1×10^8 общих клеток ТП. В некоторых вариантах осуществления эту первичную клеточную популяцию культивируют в течение периода, составляющего от 7 до 14 дней, что приводит к получению общей популяции ТП, обычно примерно 1×10^8 общих клеток ТП. В некоторых вариантах осуществления эту первичную клеточную популяцию культивируют в течение периода, составляющего от 10 до 14 дней, что приводит к получению общей популяции ТП, обычно примерно 1×10^8 общей популяции клеток ТП. В некоторых вариантах осуществления эту первичную клеточную популяцию культивируют в течение периода, составляющего примерно 11 дней, в результате чего получается общая популяция ТП, обычно примерно 1×10^8 общих клеток ТП.

В предпочтительном варианте осуществления размножение ТП может быть выполнено с использованием стадии первоначального размножения общих ТП, как описано ниже и в настоящем документе, с последующим вторым размножением (включая стадии протокола быстрого размножения (REP) и последующие стадии повторной стимуляции REP), как описано ниже и в настоящем документе.

В предпочтительном варианте осуществления криоконсервированную дезагрегированную опухолевую ткань оттаивают и ресуспендируют в соотношении 1:9 в Т-клеточной среде (Т-клеточная культуральная среда, изготовленная по заказу для фирмы Immetacyte, дополненная следующими добавками: 10% FBS и 3000 МЕ/мл IL-2) перед фильтрацией через встроенный фильтр 100–270 мкм и центрифугированием в центрифужной пробирке на 50 мл перед ресуспендированием в 20 мл. Образец может быть взят для анализа методом проточной цитометрии для количественного определения количества клеток HLA-A, B, C и CD58⁺ и DRAQ7⁻. В некоторых вариантах осуществления посев можно осуществлять с использованием альтернативного ручного устройства (например, гемоцитометра, но не ограничиваясь им) или альтернативного устройства для автоматизированного подсчета общего количества жизнеспособных клеток, такого как NucleoCounter™, но не ограничиваясь им; Guava®; автоматизированный анализ крови и счетчик; счетчик клеток на основе пипетки, такой как, но не ограничиваясь этим, Scepter™.

В одном варианте осуществления ресуспендированную криоконсервированную дезагрегированную ткань опухоли культивируют в сыворотке, содержащей IL-2, в условиях, которые благоприятствуют росту ТП по сравнению с опухолевыми и другими клетками. В некоторых вариантах осуществления гидролизат опухоли

инкубируют в лунках объемом 2 мл в среде, содержащей инактивированную сыворотку АВ человека (или, в некоторых случаях, как описано в настоящем документе, в присутствии искусственной антигенпрезентирующей популяции клеток [aAPC]) с 6000 МЕ/мл IL-2. Эту первичную клеточную популяцию культивируют в течение нескольких дней, обычно от 10 до 14 дней, в результате чего получают общую популяцию TIL, обычно примерно 1×10^8 общих клеток TIL. В некоторых вариантах осуществления среда для роста во время первого размножения содержит IL-2 или его вариант. В некоторых вариантах осуществления IL представляет собой рекомбинантный человеческий IL-2 (rhIL-2). В некоторых вариантах осуществления исходный раствор IL-2 имеет специфическую активность $20-30 \times 10^6$ МЕ/мг на флакон 1 мг. В некоторых вариантах осуществления исходный раствор IL-2 имеет специфическую активность 20×10^6 МЕ/мг на флакон 1 мг. В некоторых вариантах осуществления исходный раствор IL-2 имеет специфическую активность 25×10^6 МЕ/мг на флакон 1 мг. В некоторых вариантах осуществления исходный раствор IL-2 имеет специфическую активность 30×10^6 МЕ/мг на флакон 1 мг. В некоторых вариантах осуществления исходный раствор IL-2 имеет конечную концентрацию $4-8 \times 10^6$ МЕ/мг IL-2. В некоторых вариантах осуществления исходный раствор IL-2 имеет конечную концентрацию $5-7 \times 10^6$ 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 первая культуральная среда для размножения содержит примерно 10000 МЕ/мл IL-2, примерно 9000 МЕ/мл IL-2, примерно 8000 МЕ/мл IL-2, примерно 7000 МЕ/мл IL-2, примерно 6000 МЕ/мл IL-2 или примерно 5000 МЕ/мл IL-2. В некоторых вариантах осуществления первая культуральная среда для размножения содержит от примерно 9000 МЕ/мл IL-2 до примерно 5000 МЕ/мл IL-2. В некоторых вариантах осуществления первая культуральная среда для размножения содержит от примерно 8000 МЕ/мл IL-2 до примерно 6000 МЕ/мл IL-2. В некоторых вариантах осуществления первая культуральная среда для размножения содержит от примерно 7000 МЕ/мл IL-2 до примерно 6000 МЕ/мл IL-2. В некоторых вариантах осуществления первая культуральная среда для размножения содержит примерно 6000 МЕ/мл IL-2. В одном варианте осуществления среда для культивирования клеток дополнительно содержит IL-2. В некоторых вариантах осуществления среда для культивирования клеток содержит примерно 3000 МЕ/мл IL-2. В одном варианте осуществления среда для культивирования клеток дополнительно содержит IL-2. В предпочтительном варианте осуществления среда для культивирования клеток содержит примерно 3000

МЕ/мл ПЛ-2. В одном варианте осуществления среда для культивирования клеток содержит примерно 1000 МЕ/мл, примерно 1500 МЕ/мл, примерно 2000 МЕ/мл, примерно 2500 МЕ/мл, примерно 3000 МЕ/мл, примерно 3500 МЕ/мл, примерно 4000 МЕ/мл, примерно 4500 МЕ/мл, примерно 5000 МЕ/мл, примерно 5500 МЕ/мл, примерно 6000 МЕ/мл, примерно 6500 МЕ/мл, примерно 7000 МЕ/мл, примерно 7500 МЕ/мл или примерно 8000 МЕ/мл ПЛ-2. В одном варианте осуществления среда для культивирования клеток содержит 1000-2000 МЕ/мл, 2000-3000 МЕ/мл, 3000-4000 МЕ/мл, 4000-5000 МЕ/мл, 5000-6000 МЕ/мл, 6000-7000 МЕ/мл, 7000-8000 МЕ/мл или примерно 8000 МЕ/мл ПЛ-2.

В некоторых вариантах осуществления первая культуральная среда для размножения содержит примерно 500 МЕ/мл ПЛ-12, примерно 400 МЕ/мл ПЛ-12, примерно 300 МЕ/мл ПЛ-12, примерно 200 МЕ/мл ПЛ-12, примерно 180 МЕ/мл ПЛ-12, примерно 160 МЕ/мл ПЛ-12, примерно 140 МЕ/мл ПЛ-12, примерно 120 МЕ/мл ПЛ-12 или примерно 100 МЕ/мл ПЛ-12. В некоторых вариантах осуществления первая культуральная среда для размножения содержит от примерно 500 МЕ/мл ПЛ-12 до примерно 100 МЕ/мл ПЛ-12. В некоторых вариантах осуществления первая культуральная среда для размножения содержит от примерно 400 МЕ/мл ПЛ-12 до примерно 100 МЕ/мл ПЛ-12. В некоторых вариантах осуществления первая культуральная среда для размножения содержит от примерно 300 МЕ/мл ПЛ-12 до примерно 100 МЕ/мл ПЛ-12. В некоторых вариантах осуществления первая культуральная среда для размножения содержит примерно 200 МЕ/мл ПЛ-12. В некоторых вариантах осуществления среда для культивирования клеток содержит примерно 180 МЕ/мл ПЛ-12. В одном варианте осуществления среда для культивирования клеток дополнительно содержит ПЛ-12. В предпочтительном варианте осуществления среда для культивирования клеток содержит примерно 180 МЕ/мл ПЛ-12.

В некоторых вариантах осуществления первая культуральная среда для размножения содержит примерно 500 МЕ/мл ПЛ-15, примерно 400 МЕ/мл ПЛ-15, примерно 300 МЕ/мл ПЛ-15, примерно 200 МЕ/мл ПЛ-15, примерно 180 МЕ/мл ПЛ-15, примерно 160 МЕ/мл ПЛ-15, примерно 140 МЕ/мл ПЛ-15, примерно 120 МЕ/мл ПЛ-15 или примерно 100 МЕ/мл ПЛ-15. В некоторых вариантах осуществления первая культуральная среда для размножения содержит от примерно 500 МЕ/мл ПЛ-15 до примерно 100 МЕ/мл ПЛ-15. В некоторых вариантах осуществления первая культуральная среда для размножения содержит от примерно 400 МЕ/мл ПЛ-15 до

примерно 100 МЕ/мл П-15. В некоторых вариантах осуществления первая культуральная среда для размножения содержит от примерно 300 МЕ/мл П-15 до примерно 100 МЕ/мл П-15. В некоторых вариантах осуществления первая культуральная среда для размножения содержит примерно 200 МЕ/мл П-15. В некоторых вариантах осуществления среда для культивирования клеток содержит примерно 180 МЕ/мл П-15. В одном варианте осуществления среда для культивирования клеток дополнительно содержит П-15. В предпочтительном варианте осуществления среда для культивирования клеток содержит примерно 180 МЕ/мл П-15.

В некоторых вариантах осуществления первая культуральная среда для размножения содержит примерно 500 МЕ/мл П-18, примерно 400 МЕ/мл П-18, примерно 300 МЕ/мл П-18, примерно 200 МЕ/мл П-18, 18, примерно 180 МЕ/мл П-18, примерно 160 МЕ/мл П-18, примерно 140 МЕ/мл П-18, примерно 120 МЕ/мл П-18 или примерно 100 МЕ/мл П-18. В некоторых вариантах осуществления первая культуральная среда для размножения содержит от примерно 500 МЕ/мл П-18 до примерно 100 МЕ/мл П-18. В некоторых вариантах осуществления первая культуральная среда для размножения содержит от примерно 400 МЕ/мл П-18 до примерно 100 МЕ/мл П-18. В некоторых вариантах осуществления первая культуральная среда для размножения содержит от примерно 300 МЕ/мл П-18 до примерно 100 МЕ/мл П-18. В некоторых вариантах осуществления первая культуральная среда для размножения содержит примерно 200 МЕ/мл П-18. В некоторых вариантах осуществления среда для культивирования клеток содержит примерно 180 МЕ/мл П-18. В одном варианте осуществления среда для культивирования клеток дополнительно содержит П-18. В предпочтительном варианте осуществления среда для культивирования клеток содержит примерно 180 МЕ/мл П-18.

В некоторых вариантах осуществления первая культуральная среда для размножения содержит примерно 20 МЕ/мл П-21, примерно 15 МЕ/мл П-21, примерно 12 МЕ/мл П-21, примерно 10 МЕ/мл П-21, примерно 5 МЕ/мл П-21, примерно 4 МЕ/мл П-21, примерно 3 МЕ/мл П-21, примерно 2 МЕ/мл П-21, примерно 1 МЕ/мл П-21 или примерно 0,5 МЕ/мл П-21. В некоторых вариантах осуществления первая культуральная среда для размножения содержит от примерно 20 МЕ/мл П-21 до примерно 0,5 МЕ/мл П-21. В некоторых вариантах осуществления первая культуральная среда для размножения содержит от примерно 15 МЕ/мл П-21 до

примерно 0,5 МЕ/мл ИЛ-21. В некоторых вариантах осуществления первая культуральная среда для размножения содержит от примерно 12 МЕ/мл ИЛ-21 до примерно 0,5 МЕ/мл ИЛ-21. В некоторых вариантах осуществления первая культуральная среда для размножения содержит от примерно 10 МЕ/мл ИЛ-21 до примерно 0,5 МЕ/мл ИЛ-21. В некоторых вариантах осуществления первая культуральная среда для размножения содержит от примерно 5 МЕ/мл ИЛ-21 до примерно 1 МЕ/мл ИЛ-21. В некоторых вариантах осуществления первая культуральная среда для размножения содержит примерно 2 МЕ/мл ИЛ-21. В некоторых вариантах осуществления среда для культивирования клеток содержит примерно 1 МЕ/мл ИЛ-21. В некоторых вариантах осуществления среда для культивирования клеток содержит примерно 0,5 МЕ/мл ИЛ-21. В одном варианте осуществления среда для культивирования клеток дополнительно содержит ИЛ-21. В предпочтительном варианте осуществления среда для культивирования клеток содержит примерно 1 МЕ/мл ИЛ-21.

Также для культуральной среды предусмотрены комбинации интерлейкинов, такие как, но без ограничения, ИЛ-2, ИЛ-12, ИЛ-15, ИЛ-18 и ИЛ-21. Также рассматриваются другие цитокины, такие как ИЛ-23, ИЛ-27, ИЛ-35, ИЛ-39, ИЛ-18, ИЛ-36, ИЛ-37, ИЛ-38, IFN-альфа, IFN-бета, IFN-гамма или их комбинация вместе с ИЛ-2, ИЛ-12, ИЛ-15, ИЛ-18 и ИЛ-21. Также рассматриваются антитела, такие как реагенты, блокирующие Th2, такие как, но без ограничения, ИЛ-4 (аИЛ4), анти-ИЛ-4 (аИЛ4R), анти-ИЛ-5R (аИЛ5R), анти-ИЛ-5 (аИЛ5), анти-ИЛ13R (аИЛ13R) или анти-ИЛ13 (аИЛ13).

В некоторых вариантах осуществления первое размножение ТИЛ может продолжаться в течение 1 дня, 2 дней, 3 дней, 4 дней, 5 дней, 6 дней, 7 дней, 8 дней, 9 дней, 10 дней, 11 дней, 12 дней, 13 дней или 14 дней. В некоторых вариантах осуществления первое размножение ТИЛ может продолжаться от 1 до 14 дней. В некоторых вариантах осуществления первое размножение ТИЛ может продолжаться от 2 до 14 дней. В некоторых вариантах осуществления первое размножение ТИЛ может продолжаться от 3 до 14 дней. В некоторых вариантах осуществления первое размножение ТИЛ может продолжаться от 4 до 14 дней. В некоторых вариантах осуществления первое размножение ТИЛ может продолжаться от 5 до 14 дней. В некоторых вариантах осуществления первое размножение ТИЛ может продолжаться от 6 до 14 дней. В некоторых вариантах осуществления первое размножение ТИЛ может продолжаться от 7 до 14 дней. В некоторых вариантах осуществления первое размножение ТИЛ может продолжаться от 8 до 14 дней. В некоторых вариантах осуществления первое размножение ТИЛ может продолжаться от 9 до 14 дней. В

некоторых вариантах осуществления первое размножение ТП может продолжаться от 10 до 14 дней. В некоторых вариантах осуществления первое размножение ТП может продолжаться от 11 до 14 дней. В некоторых вариантах осуществления первое размножение ТП может продолжаться от 12 до 14 дней. В некоторых вариантах осуществления первое размножение ТП может продолжаться от 13 до 14 дней. В некоторых вариантах осуществления первое размножение ТП может продолжаться в течение 14 дней. В некоторых вариантах осуществления первое размножение ТП может продолжаться от 1 до 11 дней. В некоторых вариантах осуществления первое размножение ТП может продолжаться от 2 до 11 дней. В некоторых вариантах осуществления первое размножение ТП может продолжаться от 3 до 11 дней. В некоторых вариантах осуществления первое размножение ТП может продолжаться от 4 до 11 дней. В некоторых вариантах осуществления первое размножение ТП может продолжаться от 5 до 11 дней. В некоторых вариантах осуществления первое размножение ТП может продолжаться от 6 до 11 дней. В некоторых вариантах осуществления первое размножение ТП может продолжаться от 7 до 11 дней. В некоторых вариантах осуществления первое размножение ТП может продолжаться от 8 до 11 дней. В некоторых вариантах осуществления первое размножение ТП может продолжаться от 9 до 11 дней. В некоторых вариантах осуществления первое размножение ТП может продолжаться от 10 до 11 дней. В некоторых вариантах осуществления первое размножение ТП может продолжаться в течение 11 дней.

В некоторых вариантах осуществления комбинацию П-2, П-7, П-15 и/или П-21 используют в качестве комбинации во время первого размножения. В некоторых вариантах осуществления П-2, П-7, П-15 и/или П-21, а также любые их комбинации могут быть включены во время первого размножения. В некоторых вариантах осуществления комбинацию П-2, П-15 и П-21 используют в качестве комбинации во время первого размножения.

В некоторых вариантах осуществления первое размножение проводят в биореакторе с закрытой системой. В некоторых вариантах осуществления для размножения ТП используется закрытая система, как описано в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления используется один биореактор. В некоторых вариантах осуществления в качестве одного биореактора используется, например, G-REX-10 или G-REX-100 или предпочтительно устройство согласно WO 2018/130845. В некоторых вариантах осуществления биореактор с закрытой системой представляет собой отдельный биореактор.

Предпочтительно популяция ТП, полученная в результате первого размножения, называемая как вторая популяция ТП, может быть подвергнута второму размножению (которое может включать размножения, иногда называемые «REP»). Аналогичным образом, в случае, когда генетически модифицированные ТП будут использованы в терапии, первая популяция ТП (иногда называемая общей популяцией ТП) или вторая популяция ТП (которая в некоторых вариантах осуществления может включать популяции, называемые REP ТП популяциями) могут быть подвергнуты генетическим модификациям для подходящих методов лечения до размножения или после первого размножения и до второго размножения.

Лентивирусы являются эффективными переносчиками генов благодаря их способности трансдуцировать как делящиеся, так и неделящиеся клетки. В то время как наиболее тщательно изученные векторы на основе лентивируса для генной терапии получены из вируса иммунодефицита человека (HIV) типа 1, также были разработаны векторы для генной терапии на основе других лентивирусов приматов и не приматов, включая HIV-2, SIV, вирус иммунодефицита кошек (FIV), вирус инфекционной анемии лошадей (EIAV), вирус артрита-энцефалита коз (CAEV), вирус Висны и вирус болезни Джембрана (JDV).

Дефектные по репликации вирусные векторы являются важными с точки зрения предупреждения инфицирования пациента потенциально смертельным вирусом. Лентивирусные векторы были разработаны с целью повышения безопасности и эффективности. Недавние векторы третьего поколения удалили все дополнительные гены, способствующие вирулентности и патогенности, при этом расщепив оставшиеся гены, которые являются жизненно важными для экспрессии трансгена с трех плазмид. См., например, публикацию патента США 2006/0024274.

Было показано, что векторы для переноса генов EIAV являются эффективными в отношении трансдукции пролиферирующих и G₁-арестованных клеток *in vitro*. Mitrophanous, et al., 1999. Stable gene transfer to the nervous system using a non-primate lentiviral vector. *Gene Ther.* 6: 1808–1818; Olsen, J. C. , 1998, Gene transfer vectors derived from equine infectious anemia virus. *Gene Ther.* 5 : 1481–1487; Olsen, J.C., 2001, EIAV, CAEV and Other Lentivirus Vector Systems, *Somat Cell Mol Genet*, Vol. 26, Nos. 1/6, 131-45.

В работе Heemskerk, B. et al., 2008, Adoptive cell therapy for patients with melanoma, using tumor-infiltrating lymphocytes genetically engineered to secrete interleukin-2. *Human gene therapy*, 19(5), 496–510 описаны ТП, генетически сконструированные

для экспрессии IL-2 для продления выживания TIL. TIL пациента трансфицировали во время первого размножения ретровирусным вектором на основе вируса мышинного лейкоза Молони (MMLV) с последующим вторым размножением для получения количества, достаточного для лечения.

Вкратце, вектор SBIL2, содержащий остов MFG, полученный из вируса мышинного лейкоза Молони (MMLV), с кДНК-копией гена IL-2 человека под контролем 5'-длинного концевой повтора (LTR) в качестве промотора псевдотипировали в пакующей клеточной линии PG13, которая обеспечивает белок оболочки вируса лейкемии обезьян гиббона (GaLV). Был создан стабильный клон-производитель (PG13SBIL2#3), который содержал три копии встроенной ретровирусной ДНК IL-2. Клинический ретровирусный супернатант SBIL2 класса GMP был получен National Gene Vector Laboratory at Indiana University (Indianapolis, IN). Для трансдукции TIL 6-луночные планшеты без тканевых культур (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ) покрывали ретронектином (CH-296, 25 мкг/мл в фосфатно-солевом буферном растворе [PBS], класс GMP; Takara Bio, Otsu, Japan), блокировали PBS-2% сывороточный альбумин человека (HSA) и предварительно нагружали на 4 часа оттаянным вирусным супернатантом SBIL2 (5 мл на лунку) при 32°C и 10% CO₂. TIL добавляли по 3 мл на лунку в течение 18-24 ч при 37°C и 5% CO₂, переносили во второй набор планшетов, нагруженных SBIL2, и культивировали в течение дополнительных 18-24 ч, после чего TIL собирали и ресуспендировали в свежей среде.

В работе Zhang, L. et al., 2015, Tumor-infiltrating lymphocytes genetically engineered with an inducible gene encoding interleukin-12 for the immunotherapy of metastatic melanoma, *Clinical Cancer Research* 21(10), 2278–2288 описаны TIL, генетически сконструированные для селективной секреции IL-12 в месте опухоли. TIL трансдуцировали γ -ретровирусным вектором MSGV1, несущим ген, кодирующий одноцепочечный IL-12, под контролем промотора, ядерного фактора активированных T-клеток (NFAT), промотора активированных T-клеток.

MSGV-1 получен из вектора MSGV, который использует длинный концевой повтор вируса стволовых клеток мыши и содержит удлиненную область gag и последовательность Козак. Ген, кодирующий одноцепочечный IL-12 человека, синтезировали в порядке IL-12 p40, линкер G6S и IL-12 p35 под контролем NFAT-чувствительного промотора, и вставляли в вектор MSGV-1 в направлении, обратном 5' LTR. Была получена линия клеток-производителей с высоким титром на основе клеток PG13, и ретровирусный супернатант был произведен компанией NCI Surgery Branch

Vector Production Facility (Bethesda, MD) в условиях надлежащей производственной практики (GMP). Супернатант вектора был подвергнут тестированию и прошел все требуемые руководствами US Food and Drug Administration по производству рекомбинантных гамма-ретровирусных векторов для клинического применения.

Процедуру трансдукции начинали путем стимуляции опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов (TIL) с помощью 30 нг/мл анти-CD3 mAb Orthoclone ОКТ3 (Centocor Ortho Biotech, Raritan, NJ), 3000 МЕ/мл рекомбинантного человеческого ИЛ-12 и облученных дозой 4 Гр аллогенных питающих клеток РВМС в соотношении 200 питающих клеток на каждый TIL. Клетки собирали для трансдукции на 4-й и/или 5-й день с использованием покрытых RetroNectin (CH-296; Takara Bio Inc., Otsu, Japan) 6-луночных нетканевых культуральных планшетов. Супернатант вектора «нагружали центрифугированием» на покрытые планшеты путем центрифугирования при 2000g в течение 2 часов при 32°C. Супернатант ретровирусного вектора аспирировали из лунок и в каждую лунку добавляли 2×10^6 стимулированных клеток TIL с последующим центрифугированием при 1000g в течение 10 минут. Планшеты инкубировали при 37°C в течение ночи и на следующий день клетки собирали для второй трансдукции. Клетки первых пациентов в количестве 21 человека подвергли двум трансдукциям. Клетки для 12 пациентов подвергли только одной трансдукции.

В работе Jones, S. et al., 2009, Lentiviral vector design for optimal T cell receptor gene expression in the transduction of peripheral blood lymphocytes and tumor-infiltrating lymphocytes. Human gene therapy, 20(6), 630–640, описана разработка промоторов для использования в лентивирусных векторах для экспрессии генов в трансдуцированных Т-лимфоцитах и конструирование эффективных противоопухолевых Т-клеток.

TIL получали из хирургических образцов. PBL оттаивали из замороженного стока, хранившегося при -180°C, и помещали в культуру в среде AIM-V и интерлейкине-2 (ИЛ-2; Cetus, Emeryville, CA) при 300 МЕ/мл. Для стимуляции ОКТ3 клетки либо изначально помещали в среду с анти-CD3 антителом, ОКТ3 (Ortho Biotech, Bridgewater, NJ) при 50 нг/мл, либо помещали в среду ОКТ3 после трансдукции при первоначальной смене культуральной среды. Для трансдукции PBL или TIL 1×10^6 клеток доводили до конечного объема 1 мл в 24-луночном планшете, обработанном тканевой культурой, вирусным супернатантом и полибреном (конечная концентрация, 8 мкг/мл). Клетки трансдуцировали путем центрифугирования планшетов в течение 1,5 ч при $1000 \times g$, 32°C. Планшеты помещали в увлажненный инкубатор с 5% CO₂ при 37°C на ночь, и на следующий день заменяли среду. TIL подвергали протоколу быстрого

размножения (REP), как описано ранее, с использованием ОКТ3 (50 нг/мл), ИЛ-2 (5000 МЕ/мл) и облученных аллогенных мононуклеарных клеток периферической крови от трех разных доноров (отношение TIL:питающие клетки, 1:100). Через шесть дней после REP TIL трансдуцировали, как описано, и возвращали в культуру.

В работе Beane, J. D. et al., 2015, *Clinical Scale Zinc Finger Nuclease-mediated Gene Editing of PD-1 in Tumor Infiltrating Lymphocytes for the Treatment of Metastatic Melanoma. Molecular therapy*: 23(8), 1380–1390, описывается редактирование генов PD-1 в клиническом масштабе путем электропорации мРНК, кодирующей PD-1-специфическое редактирование генов, опосредованное нуклеазой «цинковых пальцев» (ZFN).

Чтобы получить достаточное количество трансдуцированных T-клеток для адоптивного переноса клеток, TIL индуцировали для пролиферации с использованием REP.46. Вкратце, 1×10^7 TIL объединяли с 1×10^9 аллогенных, облученных (5000 рад) мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC), и эти клетки суспендировали в 400 мл T-клеточной среды, содержащей 30 нг/мл ОКТ3. Клетки культивировали в колбе G-Rex100 при 37°C и 5% CO₂. Через пять дней аспирировали и заменили 200 мл среды. Через семь дней после начала REP TIL собирали и дважды промывали буфером для электропорации Nucleon Electroporation Buffer (Nucleon Laboratories, Logan, UT). Затем клетки подсчитывали и ресуспендировали в буфере для электропорации при концентрации 1×10^8 /мл. Затем клетки переносили в блок для обработки MaxCyte CL-2 и смешивали со 120 мкг/мл мРНК PD-1 ZFN (или мРНК GFP для TIL/GFP, трансфицированных GFP). Электропорацию проводили в соответствии с протоколом MaxCyte. После электропорации TIL переносили из блока обработки в колбу T-175 и помещали в инкубатор при 37°C на 20 минут. После этой стадии инкубации TIL ресуспендировали в среде AIM-V при концентрации 1×10^6 /мл. Затем клетки помещали в инкубатор при температуре 30°C для инкубации при низкой температуре в течение ночи, как описано ранее. На следующий день TIL переносили в инкубатор при 37°C и оставляли в покое до дня 10 REP (3 дня после электропорации).

В некоторых вариантах осуществления TIL, полученные в результате первого размножения, хранили до фенотипирования для селекции. В некоторых вариантах осуществления TIL, полученные в результате первого размножения, не хранили и использовали непосредственно для второго размножения. Таким образом, способы включают стадию выполнения второго размножения путем культивирования первой популяции TIL, в частности, UTIL, с дополнительными ИЛ-2, ОКТ-3 и

антигенпрезентирующими клетками (АРС) с получением второй популяции ТП. В некоторых вариантах осуществления ТП, полученные в результате первого размножения, не подвергают криоконсервации после первого размножения и до второго размножения. В некоторых вариантах осуществления переход от первого размножения ко второму размножению происходит примерно через 3 дня, 4 дня, 5 дней, 6 дней, 7 дней, 8 дней, 9 дней, 10 дней, 11 дней, 12 дней, 13 дней или через 14 дней после оттаивания криоконсервированной дезагрегированной опухолевой ткани. В некоторых вариантах осуществления переход от первого размножения ко второму размножению происходит примерно через 3-21 день после оттаивания криоконсервированной дезагрегированной опухолевой ткани. В некоторых вариантах осуществления переход от первого размножения ко второму размножению происходит примерно через 4-14 дней после оттаивания криоконсервированной дезагрегированной опухолевой ткани. В некоторых вариантах осуществления переход от первого размножения ко второму размножению происходит примерно через 4-10 дней после оттаивания криоконсервированной дезагрегированной опухолевой ткани. В некоторых вариантах осуществления переход от первого размножения ко второму размножению происходит примерно через 7-14 дней после оттаивания криоконсервированной дезагрегированной опухолевой ткани. В некоторых вариантах осуществления переход от первого размножения ко второму размножению происходит примерно через 14 дней после оттаивания криоконсервированной дезагрегированной опухолевой ткани. В некоторых вариантах осуществления посев культуры REP происходит через 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 или 21 день после размораживания криоконсервированной дезагрегированной опухолевой ткани.

В некоторых вариантах осуществления переход от первого размножения ко второму размножению происходит через 1 день, 2 дня, 3 дня, 4 дня, 5 дней, 6 дней, 7 дней, 8 дней, 9 дней, 10 дней, 11 дней, 12 дней, 13 дней или 14 дней после оттаивания криоконсервированной дезагрегированной опухолевой ткани. В некоторых вариантах осуществления переход от первого размножения ко второму размножению происходит через 1-14 дней после оттаивания криоконсервированной дезагрегированной опухолевой ткани. В некоторых вариантах осуществления первое размножение ТП может продолжаться от 2 до 14 дней. В некоторых вариантах осуществления переход от первого размножения ко второму размножению происходит через 3-14 дней после оттаивания криоконсервированной дезагрегированной опухолевой ткани. В некоторых вариантах осуществления переход от первого размножения ко второму размножению

осуществления переход от первого размножения ко второму размножению происходит через 4-11 дней после оттаивания криоконсервированной дезагрегированной опухолевой ткани. В некоторых вариантах осуществления переход от первого размножения ко второму размножению происходит через 5-11 дней после оттаивания криоконсервированной дезагрегированной опухолевой ткани. В некоторых вариантах осуществления переход от первого размножения ко второму размножению происходит через 6-11 дней после оттаивания криоконсервированной дезагрегированной опухолевой ткани. В некоторых вариантах осуществления переход от первого размножения ко второму размножению происходит через 7-11 дней после оттаивания криоконсервированной дезагрегированной опухолевой ткани. В некоторых вариантах осуществления переход от первого размножения ко второму размножению происходит через 8-11 дней после оттаивания криоконсервированной дезагрегированной опухолевой ткани. В некоторых вариантах осуществления переход от первого размножения ко второму размножению происходит через 9-11 дней после оттаивания криоконсервированной дезагрегированной опухолевой ткани. В некоторых вариантах осуществления переход от первого размножения ко второму размножению происходит через 10-11 дней после оттаивания криоконсервированной дезагрегированной опухолевой ткани. В некоторых вариантах осуществления переход от первого размножения ко второму размножению происходит через 11 дней после оттаивания криоконсервированной дезагрегированной опухолевой ткани.

В некоторых вариантах осуществления ТП не хранят после первого размножения и перед вторым размножением, и ТП используют непосредственно на втором размножении. В некоторых вариантах переход происходит в закрытой системе, как описано в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления ТП, полученные в результате первого размножения, вторую популяцию ТП, направляют непосредственно во второе размножение без переходного периода.

В некоторых вариантах осуществления переход от первого размножения ко второму размножению осуществляется в биореакторе с закрытой системой. В некоторых вариантах осуществления закрытая система используется для размножения ТП, как описано в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления используется один биореактор. В некоторых вариантах осуществления единственным используемым биореактором является, например, биореактор G-REX-10, или G-REX-100, или Xuri WAVE. В некоторых вариантах осуществления биореактор с закрытой системой представляет собой отдельный биореактор.

В некоторых вариантах осуществления популяция клеток ТП увеличивается в количестве после сбора и первоначальной массовой обработки. Это дополнительное размножение упоминается в настоящем документе как второе размножение, которое может включать процессы размножения, обычно называемые в данной области процессом быстрого размножения. Второе размножение обычно осуществляют с использованием культуральной среды, содержащей ряд компонентов, включая питающие клетки, источник цитокинов и анти-CD3 антитело, в газопроницаемом или газообменном контейнере.

В некоторых вариантах осуществления второе размножение или второе размножение ТП можно проводить с использованием любых культуральных флаконов или контейнеров для ТП, известных специалистам в данной области. В некоторых вариантах осуществления второе размножение ТП может продолжаться в течение 7 дней, 8 дней, 9 дней, 10 дней, 11 дней, 12 дней, 13 дней или 14 дней. В некоторых вариантах осуществления второе размножение ТП может продолжаться от примерно 7 дней до примерно 14 дней. В некоторых вариантах осуществления второе размножение ТП может продолжаться от примерно 8 до примерно 14 дней. В некоторых вариантах осуществления второе размножение ТП может продолжаться от примерно 9 до примерно 14 дней. В некоторых вариантах осуществления второе размножение ТП может продолжаться от примерно 10 до примерно 14 дней. В некоторых вариантах осуществления второе размножение ТП может продолжаться от примерно 11 до примерно 14 дней. В некоторых вариантах осуществления второе размножение ТП может продолжаться от примерно 12 до примерно 14 дней. В некоторых вариантах осуществления второе размножение ТП может продолжаться от примерно 13 до примерно 14 дней. В некоторых вариантах второе размножение ТП может продолжаться примерно 14 дней.

В одном варианте осуществления второе расширение может быть выполнено в газопроницаемом контейнере с использованием способов по настоящему раскрытию. Например, ТП можно быстро размножить с помощью неспецифической стимуляции Т-клеточного рецептора в присутствии интерлейкина-2 (IL-2), интерлейкина-7 (IL-7) или интерлейкина-15 (IL-15); IL-12. Неспецифический стимулятор Т-клеточного рецептора может включать, например, анти-CD3 антитело, такое как примерно 30 нг/мл ОКТ3, мышинное моноклональное анти-CD3 антитело (коммерчески доступное от Ortho-McNeil, Raritan, N.J. или Miltenyi Biotech, Auburn, Calif.) или UHCT-1 (коммерчески доступный от BioLegend, San Diego, Calif., USA). ТП могут быть размножены для

индукции дополнительной стимуляции TIL *in vitro* путем включения одного или нескольких антигенов во время второго размножения, включая их антигенные части, такие как эпитоп(ы), рака, которые могут быть необязательно экспрессированы из вектора, такого как пептида, связывающий человеческий лейкоцитарный антиген A2 (HLA-A2), например, 0,3 мкМ MART-1:26-35 (27 L) или gpI 00:209-217 (210M), необязательно в присутствии Т-клеточного фактора роста, такого как 300 МЕ/мл IL-2 или IL-15. Другие подходящие антигены могут включать, например, NY-ESO-1, TRP-1, TRP-2, раковый антиген тирозиназу, MAGE-A3, SSX-2 и VEGFR2 или их антигенные части. TIL также могут быть быстро размножены путем повторной стимуляции тем же антигеном(ами) рака, который введен в HLA-A2-экспрессирующие антигенпрезентирующие клетки. Альтернативно, TIL можно дополнительно повторно стимулировать, например, облученными аутологичными лимфоцитами или облученными аллогенными лимфоцитами HLA-A2+ и IL-2. В некоторых вариантах осуществления повторная стимуляция происходит как часть второго размножения. В некоторых вариантах осуществления второе размножение происходит в присутствии облученных аутологичных лимфоцитов или облученных аллогенных лимфоцитов HLA-A2+ и IL-2.

В одном варианте осуществления среда для культивирования клеток дополнительно содержит IL-2. В некоторых вариантах осуществления среда для культивирования клеток содержит примерно 3000 МЕ/мл IL-2. В одном варианте осуществления среда для культивирования клеток содержит примерно 100 МЕ/мл, примерно 200 МЕ/мл, примерно 300 МЕ/мл, примерно 400 МЕ/мл, примерно 500 МЕ/мл, примерно 600 МЕ/мл, примерно 700 МЕ/мл, примерно 800 МЕ/мл, примерно 900 МЕ/мл, 1000 МЕ/мл, примерно 1500 МЕ/мл, примерно 2000 МЕ/мл, примерно 2500 МЕ/мл, примерно 3000 МЕ/мл, примерно 3500 МЕ/мл, примерно 4000 МЕ/мл, примерно 4500 МЕ/мл, примерно 5000 МЕ/мл, примерно 5500 МЕ/мл, примерно 6000 МЕ/мл, примерно 6500 МЕ/мл, примерно 7000 МЕ/мл, примерно 7500 МЕ/мл или примерно 8000 МЕ /мл IL-2. В одном варианте осуществления среда для культивирования клеток содержит 1000-2000 МЕ/мл, 2000-3000 МЕ/мл, 3000-4000 МЕ/мл, 4000-5000 МЕ/мл, 5000-6000 МЕ/мл, 6000-7000 МЕ/мл, 7000-8000 МЕ/мл или 8000 МЕ/мл IL-2.

В одном варианте осуществления среда для культивирования клеток содержит антитело ОКТ3. В некоторых вариантах осуществления среда для культивирования клеток содержит примерно 30 нг/мл антитела ОКТ3. В одном варианте осуществления

среда для культивирования клеток содержит примерно 0,1 нг/мл, примерно 0,5 нг/мл, примерно 1 нг/мл, примерно 2,5 нг/мл, примерно 5 нг/мл, примерно 7,5 нг/мл, примерно 10 нг/мл, примерно 15 нг/мл, примерно 20 нг/мл, примерно 25 нг/мл, примерно 30 нг/мл, примерно 35 нг/мл, примерно 40 нг/мл, примерно 50 нг/мл, примерно 60 нг/мл, примерно 70 нг/мл, примерно 80 нг/мл, примерно 90 нг/мл, примерно 100 нг/мл, примерно 200 нг/мл, примерно 500 нг/мл и примерно 1 мкг/мл антитела ОКТ3. В одном варианте осуществления среда для культивирования клеток содержит от 0,1 нг/мл до 1 нг/мл, от 1 нг/мл до 5 нг/мл, от 5 нг/мл до 10 нг/мл, от 10 нг/мл до 20 нг /мл, от 20 нг/мл до 30 нг/мл, от 30 нг/мл до 40 нг/мл, от 40 нг/мл до 50 нг/мл и от 50 нг/мл до 100 нг/мл антитела ОКТ3.

В некоторых вариантах осуществления комбинацию IL-2, IL-7, IL-15 и/или IL-21 используют в виде комбинации во время второго размножения. В некоторых вариантах осуществления IL-2, IL-7, IL-15 и/или IL-21, а также любые их комбинации могут быть включены во время второго размножения. В некоторых вариантах осуществления комбинацию IL-2, IL-15 и IL-21 используют в виде комбинации во время второго размножения. В некоторых вариантах осуществления могут быть включены IL-2, IL-15 и IL-21, а также любые их комбинации.

В некоторых вариантах осуществления второе размножение можно проводить в среде для культивирования клеток с добавками, содержащей IL-2, ОКТ-3 и антиген-презентирующие питающие клетки. В некоторых вариантах осуществления второе размножение происходит в среде для культивирования клеток с добавками. В некоторых вариантах осуществления среда для культивирования клеток с добавками содержит IL-2, ОКТ-3 и антиген-презентирующие питающие клетки. В некоторых вариантах осуществления вторая среда для культивирования клеток содержит IL-2, ОКТ-3 и антигенпрезентирующие клетки (APC; также называемые антиген-презентирующими питающими клетками). В некоторых вариантах осуществления второе размножение происходит в среде для культивирования клеток, содержащей IL-2, ОКТ-3 и антигенпрезентирующие питающие клетки (т.е. антигенпрезентирующие клетки).

В некоторых вариантах осуществления вторая культуральная среда для размножения содержит примерно 500 МЕ/мл IL-15, примерно 400 МЕ/мл IL-15, примерно 300 МЕ/мл IL-15, примерно 200 МЕ/мл IL-15, примерно 180 МЕ/мл IL-15, примерно 160 МЕ/мл IL-15, примерно 140 МЕ/мл IL-15, примерно 120 МЕ/мл IL-15 или примерно 100 МЕ/мл IL-15. В некоторых вариантах осуществления вторая

В некоторых вариантах осуществления антигенпрезентирующие питающие клетки (APC) представляют собой РВМС. В одном варианте осуществления отношение ТП к РВМС и/или антигенпрезентирующим клеткам при быстром размножении и/или втором размножении составляет примерно 1 к 25, примерно 1 к 50, примерно 1 к 100, примерно 1 к 125, примерно 1 к 150, примерно 1 к 175, примерно 1 к 200, примерно 1 к 225, примерно 1 к 250, примерно 1 к 275, примерно 1 к 300, примерно 1 к 325, примерно 1 к 350, примерно 1 к 375, примерно 1 к 400 или примерно 1 к 500. В одном варианте осуществления отношение ТП к РВМС при быстром размножении и/или втором размножении находится в диапазоне от 1 к 50 до от 1 до 300. В одном варианте осуществления отношение ТП к РВМС при быстром размножении и/или втором размножении находится в диапазоне от 1 до 100 до от 1 до 200.

В одном варианте осуществления REP и/или второе размножение проводят в колбах с общими ТП, смешанными со 100- или 200-кратным избытком инактивированных питающих клеток, 30 мг/мл анти-CD3 антитела ОКТ3 и 3000 МЕ/мл IL-2 в 150 мл среды. Производится замена среды (обычно замена 2/3 среды посредством респирации свежей средой) 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 описано ниже.

В некоторых вариантах осуществления второе размножение (которое может включать процессы, называемые процессом REP) сокращается до 7-14 дней, как обсуждается в примерах и на фигурах. В некоторых вариантах осуществления второе размножение сокращается до 11 дней.

В одном варианте осуществления REP и/или второе размножение могут быть выполнены с использованием колб T-175 и газопроницаемых пакетов, как описано ранее (Tran, et al., J. Immunother. 2008, 31, 742-51; Dudley, et al., J. Immunother. 2003, 26, 332-42) или газопроницаемой культуральной посуды (колбы G-Rex). В некоторых вариантах осуществления второе размножение (включая размножения, называемые быстрыми размножениями) проводят в колбах T-175, и в каждую колбу T-175 добавляют примерно 1×10^6 ТП, суспендированных в 150 мл среды. ТП можно культивировать в смеси 1:1 среды CM и AIM-V с добавлением 3000 МЕ на мл IL-2 и 30 нг на мл анти-CD3. Колбы T-175 инкубируют при 37°C в 5% CO₂. Половину среды заменяют на 5-й день, используя среду 50/50 с 3000 МЕ на мл IL-2. В некоторых вариантах осуществления на 7-й день клетки из двух колб T-175 объединяют в 3 л

пакет и 300 мл AIM V с 5% человеческой сывороткой АВ и 3000 МЕ на мл IL-2 добавляют к 300 мл суспензии TIL. Количество клеток в каждом пакете подсчитывают каждый день или два, и добавляют свежую среду, чтобы поддерживать количество клеток в пределах от 0,5 до $2,0 \times 10^6$ клеток/мл.

В одном варианте осуществления второе размножение может быть выполнено в газопроницаемых колбах емкостью 500 мл с газопроницаемым силиконовым дном диаметром 100 см (G-Rex 100, коммерчески доступные от Wilson Wolf Manufacturing Corporation, New Brighton, Minn., USA), 5×10^6 или 10×10^6 TIL культивируют с PVMC в 400 мл среды 50/50, дополненной 5% человеческой сывороткой АВ, 3000 МЕ на мл IL-2 и 30 нг на мл анти-CD3 (ОКТ3). Колбы G-Rex 100 инкубируют при 37°C в 5% CO₂. На 5-й день отбирают 250 мл супернатанта, помещают в центрифужные флаконы и центрифугируют при 1500 об/мин (491xg) в течение 10 минут. Осадок TIL ресуспендируют в 150 мл свежей среды с 5% человеческой сывороткой АВ, 3000 МЕ на мл IL-2 и добавляют обратно в исходные колбы G-Rex 100. Когда TIL серийно размножают в колбах G-Rex 100, на 7-й день TIL в каждой колбе G-Rex 100 суспендируют в 300 мл среды, присутствующей в каждой колбе, и клеточную суспензию разделяют на 3 аликвоты по 100 мл, которые можно использовать для засева 3 колб G-Rex 100. Затем в каждую колбу вносят 150 мл AIM-V с 5% человеческой сывороткой АВ и 3000 МЕ на мл IL-2. Колбы G-Rex 100 инкубируют при 37°C в 5% CO₂ и через 4 дня в каждую колбу G-REX 100 добавляют 150 мл AIM-V с 3000 МЕ на мл IL-2. Клетки можно собирать на 14-й день культивирования.

В одном варианте осуществления второе размножение (включая размножения, называемые REP) проводят в колбах с общими TIL, смешанными со 100- или 200-кратным избытком инактивированных питающих клеток, 30 мг/мл анти-CD3 антитела ОКТ3 и 3000 МЕ/мл IL-2 в 150 мл среды. В некоторых вариантах осуществления замену среды проводят до тех пор, пока клетки не будут перенесены в альтернативную камеру для выращивания. В некоторых вариантах осуществления 2/3 среды заменяется дыханием свежей средой. В некоторых вариантах осуществления альтернативные камеры для выращивания включают колбы G-REX и газопроницаемые контейнеры, как более подробно описано ниже.

В одном варианте осуществления выполняют второе размножение (включая размножения, называемые REP), которое дополнительно включает стадию, на которой TIL выбирают по более высокой реактивности опухоли. Можно использовать любой метод отбора, известный в данной области. Например, способы, описанные в

публикации заявки на патент США № 2016/0010058 A1, можно использовать для отбора TIL по более высокой реактивности опухоли.

Необязательно, анализ жизнеспособности клеток может быть выполнен после второго размножения (включая размножения, называемые REP-размножением), с использованием стандартных анализов, известных в данной области. Например, анализ исключения трипанового синего можно провести на образце общих TIL, который избирательно метит мертвые клетки и позволяет оценить жизнеспособность. В некоторых вариантах осуществления образцы TIL подсчитывают и определяют их жизнеспособность с использованием автоматизированного счетчика клеток Cellometer K2 (Nexcelom Bioscience, Lawrence, MA).

В некоторых вариантах осуществления второе размножение (включая размножения, называемые REP) TIL проводят с использованием колб T-175 и газопроницаемых пакетов, как описано ранее (Tran K Q, Zhou J, Durflinger K H, et al., 2008, *J Immunother.*, 31:742-751, and Dudley M E, Wunderlich J R, Shelton T E, et al. 2003, *J Immunother.*, 26:332-342), или газопроницаемых колб G-Rex. В некоторых вариантах осуществления второе размножение проводят с использованием колб. В некоторых вариантах осуществления второе размножение проводят с использованием газопроницаемых колб G-Rex. В некоторых вариантах осуществления второе размножение проводят в колбах T-175, и примерно 1×10^6 TIL суспендируют примерно в 150 мл среды и добавляют в каждую колбу T-175. TIL культивируют с облученными (50 Гр) аллогенными РВМС в качестве «питающих» клеток в соотношении 1 к 100, и клетки культивируют в смеси 1 к 1 среды CM и AIM-V (среда 50/50), дополненной 3000 МЕ/мл IL-2 и 30 нг/мл анти-CD3. Колбы T-175 инкубируют при 37°C в 5% CO₂. В некоторых вариантах осуществления половину среды заменяют на 5-й день с использованием среды 50/50 с 3000 МЕ/мл IL-2. В некоторых вариантах осуществления на 7-й день клетки из 2 колб T-175 объединяют в 3 л пакете и 300 мл AIM-V с 5% человеческой сывороткой АВ и 3000 МЕ/мл IL-2 добавляют к 300 мл суспензии TIL. Количество клеток в каждом пакете подсчитывают каждый день или два, и можно добавлять свежую среду, чтобы поддерживать количество клеток в пределах от примерно 0,5 до примерно $2,0 \times 10^6$ клеток/мл.

В некоторых вариантах осуществления второе размножение (включая размножения, называемые REP) проводят в колбах вместимостью 500 мл с газопроницаемым силиконовым дном площадью 100 см² (G-Rex 100, Wilson Wolf), примерно 5×10^6 или 10×10^6 TIL культивируют с облученными аллогенными РВМС в

соотношении 1 к 100 в 400 мл среды 50/50, дополненной 3000 МЕ/мл IL-2 и 30 нг/мл анти-CD3. Колбы G-Rex 100 инкубируют при 37°C в 5% CO₂. В некоторых вариантах осуществления на 5-й день 250 мл супернатанта удаляют, помещают в центрифужные колбы и центрифугируют при 1500 об/мин (491 г) в течение 10 минут. Затем осадок ТП ресуспендируют в 150 мл свежей среды 50/50 с 3000 МЕ/мл IL-2 и добавляют обратно в исходные колбы G-Rex 100. В вариантах осуществления, в которых ТП серийно размножают в колбах G-Rex 100, на 7-й день ТП в каждой колбе G-Rex 100 суспендируют в 300 мл среды, присутствующей в каждой колбе, и клеточную суспензию делят на три аликвоты по 100 мл, которые используют для засева 3 колб G-Rex 100. Затем в каждую колбу добавляют по 150 мл AIM-V с 5% человеческой сывороткой АВ и 3000 МЕ/мл IL-2. Колбы G-Rex 100 инкубируют при 37°C в 5% CO₂ и через 4 дня в каждую колбу G-Rex 100 добавляют 150 мл AIM-V с 3000 МЕ/мл IL-2. Клетки собирают на 14 день культивирования.

Разнообразные антигенные рецепторы Т- и В-лимфоцитов продуцируются путем соматической рекомбинации ограниченного, но большого количества генных сегментов. Эти генные сегменты: V (вариабельный), D (разнообразный), J (соединительный) и C (константный) определяют специфичность связывания и последующие применения иммуноглобулинов и Т-клеточных рецепторов (TCR). Настоящее изобретение обеспечивает способ генерирования ТП, которые демонстрируют и увеличивают разнообразие репертуара Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления ТП, полученные с помощью предлагаемого способа, демонстрируют увеличение разнообразия репертуара Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления ТП, полученные во втором размножении, 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 иммуноглобулина находится в тяжелой цепи иммуноглобулина. В некоторых вариантах осуществления разнообразие иммуноглобулина находится в легкой цепи иммуноглобулина. В некоторых вариантах осуществления разнообразие находится в Т-клеточном рецепторе. В некоторых вариантах осуществления разнообразие находится в одном из Т-клеточных рецепторов, выбранных из группы, состоящей из альфа-, бета-, гамма- и дельта-рецепторов. 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. TCR α/β).

В некоторых вариантах осуществления вторая среда для размножения (например, иногда называемая CM2 или вторая среда для культивирования клеток) содержит IL-2, ОКТ-3, а также антигенпрезентирующие питающие клетки (APC).

В некоторых вариантах осуществления второе размножение проводят в биореакторе с закрытой системой. В некоторых вариантах осуществления для размножения ТП используется закрытая система, как описано в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления используется один биореактор. В некоторых вариантах осуществления в качестве одного используемого биореактора используется, например, G-REX-10 или G-REX-100 или предпочтительно устройство согласно WO 2018/130845. В некоторых вариантах осуществления биореактор с закрытой системой представляет собой отдельный биореактор.

В одном варианте осуществления процедуры второго размножения, описанные в настоящем документе, а также те, которые упоминаются как REP, требуют избытка питающих клеток во время размножения REP ТП и/или во время второго размножения. Во многих вариантах осуществления питающие клетки представляют собой мононуклеарные клетки периферической крови (PBMC), полученные из стандартных единиц цельной крови здоровых доноров крови. PBMC получают с использованием стандартных методов, таких как разделение в градиенте плотности с использованием Ficoll-Paque.

Как правило, аллогенные PBMC инактивируют посредством облучения или термической обработки и используют в процедурах REP, что представляет собой типовой протокол для оценки репликационной некомпетентности облученных аллогенных PBMC.

В некоторых вариантах осуществления PBMC считаются неспособными к репликации и допускаются для использования в процедурах размножения ТП, описанных в настоящем документе, если общее количество жизнеспособных клеток на 14-й день меньше первоначального количества жизнеспособных клеток, помещенных в культуру на 0-й день REP и/или 0-й день второго размножения (т.е. день начала второго размножения).

В некоторых вариантах осуществления РВМС считаются неспособными к репликации и допускаются для использования в процедурах размножения ТП, описанных в настоящем документе, если общее количество жизнеспособных клеток, культивируемых в присутствии ОКТЗ и IL-2, на 7-й и 14-й день не увеличилось по сравнению с исходным числом жизнеспособных клеток, помещенных в культуру в 0-й день REP и/или 0-й день второго размножения (т.е. день начала второго размножения). В некоторых вариантах осуществления РВМС культивируют в присутствии 30 нг/мл антитела ОКТЗ и 3000 МЕ/мл IL-2.

В некоторых вариантах осуществления РВМС считаются неспособными к репликации и допускаются для использования в процедурах размножения ТП, описанных в настоящем документе, если общее количество жизнеспособных клеток, культивируемых в присутствии ОКТЗ и IL-2, на 7-й и 14-й день не увеличилось по сравнению с исходным числом жизнеспособных клеток, помещенных в культуру в 0-й день REP и/или 0-й день второго размножения (т.е. день начала второго размножения). В некоторых вариантах осуществления РВМС культивируют в присутствии 5-60 нг/мл антитела ОКТЗ и 1000-6000 МЕ/мл IL-2. В некоторых вариантах осуществления РВМС культивируют в присутствии 10-50 нг/мл антитела ОКТЗ и 2000-5000 МЕ/мл IL-2. В некоторых вариантах осуществления РВМС культивируют в присутствии 20-40 нг/мл антитела ОКТЗ и 2000-4000 МЕ/мл IL-2. В некоторых вариантах осуществления РВМС культивируют в присутствии 25-35 нг/мл антитела ОКТЗ и 2500-3500 МЕ/мл IL-2.

В некоторых вариантах осуществления антигенпрезентирующие питающие клетки представляют собой РВМС. В некоторых вариантах осуществления антигенпрезентирующие питающие клетки представляют собой искусственные антигенпрезентирующие питающие клетки. В одном варианте осуществления отношение ТП к антигенпрезентирующим питающим клеткам во втором размножении составляет примерно 1 к 25, примерно 1 к 50, примерно 1 к 100, примерно 1 к 125, примерно 1 к 150, примерно 1 к 175, примерно 1 к 200, примерно 1 к 225, примерно 1 к 250, примерно 1 к 275, примерно 1 к 300, примерно 1 к 325, примерно 1 к 350, примерно 1 к 375, примерно 1 к 400 или примерно 1 к 500. В одном варианте осуществления отношение ТП к антигенпрезентирующим питающим клеткам во втором размножении составляет от 1 до 50 и от 1 до 300. В одном варианте осуществления отношение ТП к антигенпрезентирующим питающим клеткам во втором размножении составляет от 1 до 100 и от 1 до 200.

В варианте осуществления, вторые процедуры размножения, описанные в настоящем документе, требуют соотношения приблизительно $2,5 \times 10^9$ питающих клеток к примерно 100×10^6 ТП. В другом варианте осуществления описанные в настоящем документе вторые процедуры размножения требуют соотношения примерно $2,5 \times 10^9$ питающих клеток к примерно 50×10^6 ТП. В еще одном варианте осуществления описанные в настоящем документе вторые процедуры размножения требуют примерно от $2,5 \times 10^9$ питающих клеток до примерно 25×10^6 ТП.

В одном варианте осуществления процедуры второго размножения, описанные в настоящем документе, требуют избытка питающих клеток во время второго размножения. Во многих вариантах осуществления питающие клетки представляют собой мононуклеарные клетки периферической крови (РВМС), полученные из стандартных единиц цельной крови здоровых доноров крови. РВМС получают с использованием стандартных методов, таких как разделение в градиенте плотности с использованием Ficoll-Paque. В одном варианте осуществления вместо РВМС используют искусственные антигенпрезентирующие (аАРС) клетки.

Как правило, аллогенные РВМС инактивируют посредством облучения или термообработки и используют в процедуре размножения ТП.

В одном варианте осуществления искусственные антигенпрезентирующие клетки используют во втором размножении в качестве замены РВМС или в комбинации с ними.

Способы размножения, описанные в настоящем документе, обычно используют культуральную среду с высокими дозами цитокина, в частности, IL-2, как известно в данной области.

В качестве альтернативы, дополнительно возможно использование комбинаций цитокинов для быстрого размножения и/или второго размножения ТП с комбинациями двух или более IL-2, IL-15 и IL-21, как в общих чертах описано в международной публикации WO 2015/189356 и международной публикации WO 2015/189357, полностью включенных в настоящий документ посредством ссылки. 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 комбинация находит особое применение во многих вариантах осуществления. Использование комбинаций цитокинов специфически способствует образованию лимфоцитов и, в частности, Т-клеток, как описано в настоящем документе.

В некоторых вариантах осуществления культуральная среда, используемая в способах размножения, описанных в настоящем документе (включая те, которые упоминаются как REP), также включает анти-CD3 антитело. Анти-CD3 антитело в сочетании с IL-2 индуцирует активацию Т-клеток и деление клеток в популяции ТП. Этот эффект можно наблюдать с полноразмерными антителами, а также с Fab- и F(ab')₂-фрагментами, причем первые обычно предпочтительнее; см., например, работу Tsoukas et al., J. Immunol. 1985, 135, 1719, полностью включенную в настоящий документ посредством ссылки.

Как будет понятно специалистам в данной области, существует ряд подходящих антител против CD3 человека, которые находят применение в изобретении, включая поликлональные и моноклональные антитела против CD3 человека от различных млекопитающих, включая, но без ограничения, мышинные, человеческие, приматов, крысиные и собачьи антитела. В конкретных вариантах осуществления используется анти-CD3-антитело ОКТ3 (коммерчески доступное от Ortho-McNeil, Raritan, N.J. or Miltenyi Biotech, Auburn, Calif.).

После второй стадии размножения клетки можно собирать. В некоторых вариантах осуществления ТП собирают после одной, двух, трех, четырех или более стадий размножения. В некоторых вариантах осуществления ТП собирают после двух стадий размножения.

ТП можно собирать любым подходящим и стерильным способом, включая, например, центрифугирование. Способы сбора ТП хорошо известны в данной области, и любые такие известные способы могут быть использованы в предлагаемом процессе. В некоторых вариантах осуществления ТП собирают с помощью автоматизированной системы.

Харвестеры клеток и/или системы обработки клеток коммерчески доступны от различных источников, включая, например, Fresenius Kabi, Tomtec Life Science, Perkin Elmer и Inotech Biosystems International, Inc. Любой харвестер клеток может быть использован с предлагаемыми способами. В некоторых вариантах осуществления харвестер клеток и/или системы обработки клеток представляет собой харвестер клеток на основе мембраны. В некоторых вариантах осуществления сбор клеток осуществляется с помощью системы обработки клеток, такой как система LOVO (производства Fresenius Kabi). Термин «система обработки клеток LOVO» также относится к любому прибору или устройству, изготовленному любым поставщиком, которое может прокачивать раствор, содержащий клетки, через мембрану или фильтр,

такой как вращающаяся мембрана или вращающийся фильтр, в стерильной и/или закрытой среде системы, что обеспечивает возможность непрерывного потока и обработки клеток для удаления супернатанта или среды для культивирования клеток без гранулирования. В некоторых вариантах осуществления харвестер клеток и/или система обработки клеток может выполнять стадии разделения, промывки, обмена жидкости, концентрирования и/или других стадий обработки клеток в закрытой стерильной системе.

В некоторых вариантах осуществления сбор осуществляется из биореактора с закрытой системой. В некоторых вариантах осуществления для размножения ТП используется закрытая система, как описано в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления используется один биореактор. В некоторых вариантах осуществления в качестве одного используемого биореактора используется, например, G-REX-10 или G-REX-100 или предпочтительно устройство согласно WO 2018/130845. В некоторых вариантах осуществления биореактор закрытой системы представляет собой отдельный биореактор.

Клетки переносят в контейнер для использования при введении пациенту. В некоторых вариантах осуществления после получения терапевтически достаточного количества ТП с использованием способов размножения, описанных выше, их переносят в контейнер для использования при введении пациенту.

В одном варианте осуществления ТП, размноженные с использованием APC по настоящему изобретению, вводят пациенту в виде фармацевтической композиции. В одном варианте осуществления фармацевтическая композиция представляет собой суспензию ТП в стерильном буфере. ТП, размноженные с использованием RBMS по настоящему изобретению, можно вводить любым подходящим способом, известным в данной области. В некоторых вариантах осуществления Т-клетки вводят в виде однократной внутриартериальной или внутривенной инфузии, которая предпочтительно длится приблизительно от 30 до 60 минут. Другие подходящие пути введения включают внутрибрюшинный, интратекальный и внутрилимфатический пути введения.

В одном варианте осуществления ТП, размноженные с использованием способов по настоящему изобретению, вводят пациенту в виде фармацевтической композиции. В одном варианте осуществления фармацевтическая композиция представляет собой суспензию ТП в стерильном буфере. ТП, размноженные с использованием RBMS по настоящему изобретению, можно вводить любым

подходящим способом, известным в данной области. В некоторых вариантах осуществления Т-клетки вводят в виде однократной внутриартериальной или внутривенной инфузии, которая предпочтительно длится приблизительно от 30 до 60 минут. Другие подходящие способы введения включают внутривентральное, интратекальное и внутрилимфатическое введение.

Можно вводить любую подходящую дозу ТП. В некоторых вариантах осуществления вводят от примерно $2,3 \times 10^{10}$ до примерно $13,7 \times 10^{10}$ ТП, в среднем примерно $7,8 \times 10^{10}$ ТП, особенно если рак представляет собой меланому. В одном варианте осуществления вводят от примерно $1,2 \times 10^{10}$ до примерно $4,3 \times 10^{10}$ ТП. В некоторых вариантах осуществления вводят от примерно 3×10^{10} до примерно 12×10^{10} ТП. В некоторых вариантах осуществления вводят от примерно 4×10^{10} до примерно 10×10^{10} ТП. В некоторых вариантах осуществления вводят от примерно 5×10^{10} до примерно 8×10^{10} ТП. В некоторых вариантах осуществления вводят от примерно 6×10^{10} до примерно 8×10^{10} ТП. В некоторых вариантах осуществления вводят от примерно 7×10^{10} до примерно 8×10^{10} ТП. В некоторых вариантах осуществления терапевтически эффективная доза составляет от примерно $2,3 \times 10^{10}$ до примерно $13,7 \times 10^{10}$. В некоторых вариантах осуществления терапевтически эффективная доза составляет примерно $7,8 \times 10^{10}$ ТП, особенно при раке, представляющем собой меланому. В некоторых вариантах осуществления терапевтически эффективная доза составляет от примерно $1,2 \times 10^{10}$ до примерно $4,3 \times 10^{10}$ ТП. В некоторых вариантах осуществления терапевтически эффективная доза составляет от примерно 3×10^{10} до примерно 12×10^{10} ТП. В некоторых вариантах осуществления терапевтически эффективная доза составляет от примерно 4×10^{10} до примерно 10×10^{10} ТП. В некоторых вариантах осуществления терапевтически эффективная доза составляет от примерно 5×10^{10} до примерно 8×10^{10} ТП. В некоторых вариантах осуществления терапевтически эффективная доза составляет от примерно 6×10^{10} до примерно 8×10^{10} ТП. В некоторых вариантах осуществления терапевтически эффективная доза составляет от примерно 7×10^{10} до примерно 8×10^{10} ТП.

В некоторых вариантах осуществления количество ТП, представленных в фармацевтических композициях по изобретению, составляет примерно 11×10^6 , 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 варианте осуществления количество ТП, представленных в фармацевтических композициях по изобретению, находится в диапазоне 1×10^6 - 5×10^6 , 5×10^6 - 1×10^7 , 1×10^7 - 5×10^7 , 5×10^7 - 1×10^8 , 1×10^8 - 5×10^8 , 5×10^8 - 1×10^9 , 1×10^9 - 5×10^9 , 5×10^9 - 1×10^{10} , 1×10^{10} - 5×10^{10} , 5×10^{10} - 1×10^{11} , 1×10^{11} - 5×10^{11} и 5×10^{11} - 1×10^{12} .

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

В некоторых вариантах осуществления концентрация ТП, представленных в фармацевтических композициях по изобретению, составляет более 90%, 80%, 70%, 60%, 50%, 40%, 30%, 20%, 19,75%, 19,50%, 19,25% 19%, 18,75%, 18,50%, 18,25% 18%, 17,75%, 17,50%, 17,25% 17%, 16,75%, 16,50%, 16,25% 16%, 15,75%, 15,50%, 15,25% 15%, 14,75%, 14,50%, 14,25% 14%, 13,75%, 13,50%, 13,25% 13%, 12,75%, 12,50%, 12,25% 12%, 11,75%, 11,50%, 11,25% 11%, 10,75%, 10,50%, 10,25% 10%, 9,75%, 9,50%, 9,25% 9%, 8,75%, 8,50%, 8,25% 8%, 7,75%, 7,50%, 7,25% 7%, 6,75%, 6,50%, 6,25% 6%, 5,75%, 5,50%, 5,25% 5%, 4,75%, 4,50%, 4,25%, 4%, 3,75%, 3,50%, 3,25%, 3%, 2,75%, 2,50%, 2,25%, 2%, 1,75%, 1,50%, 1,25%, 1%, 0,5%, 0,4%, 0,3%, 0,2%, 0,1%, 0,09%, 0,08%, 0,07%, 0,06%, 0,05%, 0,04%, 0,03%, 0,02%, 0,01%, 0,009%, 0,008%, 0,007%, 0,006%, 0,005%, 0,004%, 0,003%, 0,002%, 0,001%, 0,0009%, 0,0008%, 0,0007%, 0,0006%, 0,0005%, 0,0004%, 0,0003%, 0,0002% или 0,0001% масс./масс., масс./об. или об./об. фармацевтической композиции.

В некоторых вариантах осуществления концентрация ТП, представленных в фармацевтических композициях по изобретению, находится в диапазоне от примерно 0,0001% до примерно 50%, от примерно 0,001% до примерно 40%, от примерно 0,01% до примерно 30%, от примерно 0,02% до примерно 29%, от примерно 0,03% до примерно 28%, от примерно 0,04% до примерно 27%, от примерно 0,05% до примерно 26%, от примерно 0,06% до примерно 25%, от примерно 0,07% до примерно 24%, от примерно 0,08% до примерно 23%, от примерно 0,09% до примерно 22%, от примерно

0,1% до примерно 21%, от примерно 0,2% до примерно 20%, от примерно 0,3% до примерно 19%, от примерно 0,4% до примерно 18%, от примерно 0,5% до примерно 17%, от примерно 0,6% до примерно 16%, от примерно 0,7% до примерно 15%, от примерно 0,8% до примерно 14%, от примерно 0,9% до примерно 12% или от примерно 1% до примерно 10% масс./масс., масс./об. или об./об. фармацевтической композиции.

В некоторых вариантах осуществления концентрация ТП, представленных в фармацевтических композициях по изобретению, находится в диапазоне от примерно 0,001% до примерно 10%, от примерно 0,01% до примерно 5%, от примерно 0,02% до примерно 4,5%, от примерно 0,03% до примерно 4%, от примерно 0,04% до примерно 3,5%, от примерно 0,05% до примерно 3%, от примерно 0,06% до примерно 2,5%, от примерно 0,07% до примерно 2%, от примерно 0,08% до примерно 1,5%, от примерно 0,09% до примерно 1%, от примерно 0,1% до примерно 0,9% масс./масс., масс./об. или об./об. фармацевтической композиции.

В некоторых вариантах осуществления количество ТП, содержащихся в фармацевтических композициях по изобретению, равно 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 или менее.

В некоторых вариантах осуществления количество ТП, содержащихся в фармацевтических композициях по 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, 0,5 г, 0,008 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, 0,085 г, 0,0085 г, 0,09 г, 0,095 г, 0,1 г, 0,15 г, 0,2 г, 0,25 г, 0,3 г, 0,35 г, 0,4 г, 0,45 г, 0,5 г, 0,55 г, 0,6 г, 0,65 г, 0,7 г, 0,75 г, 0,8 г, 0,85 г, 0,9 г, 0,95 г, 1 г, 1,5 г, 2 г, 2,5 г, 3 г, 3,5 г, 4 г, 4,5 г, 5 г, 5,5 г, 6 г, 6,5 г, 7 г, 7,5 г, 8 г, 8,5 г, 9 г, 9,5 г или 10 г.

ТП, представленные в фармацевтических композициях по изобретению, являются эффективными в широком диапазоне доз. Точная дозировка будет зависеть от пути введения, формы, в которой вводят соединение, пола и возраста субъекта, подлежащего лечению, массы тела субъекта, а также предпочтений и опыта лечащего

врача. При необходимости можно также использовать клинически установленные дозы ТП. Количества фармацевтических композиций, вводимых с использованием описанных здесь способов, такие как дозы ТП, будут зависеть от подвергаемого лечению человека или млекопитающего, тяжести нарушения или состояния, скорости введения, фармакокинетики активных фармацевтических ингредиентов и заключения лечащего врача.

В некоторых вариантах осуществления ТП можно вводить в виде однократной дозы. Такое введение может осуществляться путем инъекции, например, внутривенной инъекции. В некоторых вариантах осуществления ТП можно вводить несколькими дозами. Дозирование можно осуществлять один, два, три, четыре, пять, шесть или более шести раз в год. Дозирование можно осуществлять один раз в месяц, один раз в две недели, один раз в неделю или через день. Введение ТП может продолжаться столько, сколько это необходимо.

В некоторых вариантах осуществления эффективная доза ТП составляет примерно 1×10^6 , 2×10^6 , 3×10^6 , 4×10^6 , 5×10^6 , 6×10^6 , 7×10^6 , 8×10^6 , 9×10^6 , 1×10^7 , 2×10^7 , 3×10^7 , 4×10^7 , 5×10^7 , 6×10^7 , 7×10^7 , 8×10^7 , 9×10^7 , 1×10^8 , 2×10^8 , 3×10^8 , 4×10^8 , 5×10^8 , 6×10^8 , 7×10^8 , 8×10^8 , 9×10^8 , 1×10^9 , 2×10^9 , 3×10^9 , 4×10^9 , 5×10^9 , 6×10^9 , 7×10^9 , 8×10^9 , 9×10^9 , 1×10^{10} , 2×10^{10} , 3×10^{10} , 4×10^{10} , 5×10^{10} , 6×10^{10} , 7×10^{10} , 8×10^{10} , 9×10^{10} , 1×10^{11} , 2×10^{11} , 3×10^{11} , 4×10^{11} , 5×10^{11} , 6×10^{11} , 7×10^{11} , 8×10^{11} , 9×10^{11} , 1×10^{12} , 2×10^{12} , 3×10^{12} , 4×10^{12} , 5×10^{12} , 6×10^{12} , 7×10^{12} , 8×10^{12} , 9×10^{12} , 1×10^{13} , 2×10^{13} , 3×10^{13} , 4×10^{13} , 5×10^{13} , 6×10^{13} , 7×10^{13} , 8×10^{13} и 9×10^{13} . В некоторых вариантах осуществления эффективная доза ТП находится в диапазоне 1×10^6 - 5×10^6 , 5×10^6 - 1×10^7 , 1×10^7 - 5×10^7 , 5×10^7 - 1×10^8 , 1×10^8 - 5×10^8 , 5×10^8 - 1×10^9 , 1×10^9 - 5×10^9 , 5×10^9 - 1×10^{10} , 1×10^{10} - 5×10^{10} , 5×10^{10} - 1×10^{11} , 5×10^{11} - 1×10^{12} , 1×10^{12} - 5×10^{12} и 5×10^{12} - 1×10^{13} .

В некоторых вариантах осуществления эффективная доза ТП находится в диапазоне от примерно 0,01 мг/кг до примерно 4,3 мг/кг, от примерно 0,15 мг/кг до примерно 3,6 мг/кг, от примерно 0,3 мг/кг до примерно 3,2 мг/кг, от примерно 0,35 мг/кг до примерно 2,85 мг/кг, от примерно 0,15 мг/кг до примерно 2,85 мг/кг, от примерно 0,3 мг до примерно 2,15 мг/кг, от примерно 0,45 мг/кг до примерно 1,7 мг/кг, от примерно 0,15 мг/кг до примерно 1,3 мг/кг, от примерно 0,3 мг/кг до примерно 1,15 мг/кг, от примерно 0,45 мг/кг до примерно 1 мг/кг, от примерно 0,55 мг/кг до примерно 0,85 мг/кг, от примерно 0,65 мг/кг до примерно 0,8 мг/кг, от примерно 0,7 мг/кг до примерно 0,75 мг/кг, от примерно 0,7 мг/кг до примерно 2,15 мг/кг, от примерно 0,85 мг/кг до примерно 2 мг/кг, от примерно 1 мг/кг до примерно 1,85 мг/кг, от примерно

1,15 мг/кг до примерно 1,7 мг/кг, от примерно 1,3 мг/кг до примерно 1,6 мг/кг, от примерно 1,35 мг/кг до примерно 1,5 мг/кг, от примерно 2,15 мг/кг до от примерно 3,6 мг/кг, от примерно 2,3 мг/кг до примерно 3,4 мг/кг, от примерно 2,4 мг/кг до примерно 3,3 мг/кг, от примерно 2,6 мг/кг до примерно 3,15 мг/кг, от примерно 2,7 мг/кг до примерно 3 мг/кг, от примерно от 2,8 мг/кг до примерно 3 мг/кг или от примерно 2,85 мг/кг до примерно 2,95 мг/кг.

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

Эффективное количество ТП можно вводить в виде однократной или многократных доз любым из принятых способов введения агентов, обладающих схожими свойствами, включая интраназальный и чрескожный пути, путем внутриартериальной инъекции, внутривенно, внутрибрюшинно, парентерально, внутримышечно, подкожно, местно, путем трансплантации или путем ингаляции.

Настоящее изобретение также включает наборы, полезные для проведения диагностических и прогностических анализов с использованием ТП, в частности, УТП, по настоящему изобретению. Наборы по изобретению включают буферы, цитокины, колбы, среды, контейнеры для продуктов, реагенты и инструкции.

Ниже представлен неограничивающий многостадийный вариант обеспечения роста ТП из опухоли, обеспечения процесса быстрого размножения, подтверждения того, что облученные питающие клетки РВМС не размножаются, и переноса статической культуры в биореактор WAVE (см., например, <https://www.gelifesciences.com/en/us/shop/cell-culture-and-fermentation/rocking->

[bioreactors/consumables-and-accessories/single-use-readytoprocess-wave-cellbag-bioreactors-p-00346#overview](#)), а также и составление и заполнение.

На первой стадии (День 0) криоконсервированную дезагрегированную опухолевую ткань оттаивают и ресуспендируют в соотношении 1:9 в культуральной Т-клеточной среде с добавлением 10% FBS и 3000 МЕ/мл ИЛ-2 перед фильтрацией через встроенный фильтр 100-270 мкм и центрифугирования в центрифужной пробирке на 50 мл перед ресуспендированием в 20 мл. Образец берется для анализа методом проточной цитометрии SOP (Стандартные операционные процедуры) для количественного определения числа клеток HLA-A, B, C и CD58⁺, и DRAQ7⁻.

На второй стадии клеточную суспензию затем высевают в количестве от $\geq 0,25 \times 10^6$ до $\leq 0,75 \times 10^6$ клеток HLA-A, B, C и CD58⁺ и DRAQ7⁻/мл в CM-T (Т-клеточная среда с добавлением 10% эмбриональной бычьей сыворотки) с добавлением антибактериальных и противогрибковых агентов (амфотерицин В и гентамицин) и 1000 МЕ/мл интерлейкина-2 (ИЛ-2) в контейнерах для клеточных культур. Т-клетки выращивают в течение 2 недель в CM-T, на 5-й день половину среды удаляют и заменяют свежей средой CM-T с добавлением 10% эмбриональной бычьей сыворотки, амфотерицина В, гентамицина и ИЛ-2. Это повторяют каждые 2/3 дня между 5-м и 10-м днем, чтобы гарантировать, что клетки поддерживаются на уровне от $\leq 0,1 \times 10^6$ до 2×10^6 CD45⁺ CD3⁺ Annexin-V^{-ve} DRAQ7^{-ve} клеток/мл. Микробиологическое исследование супернатанта культуры TIL (день 5-7) по РН Eug 2.6.27 подтвердило отсутствие микробного роста. Анализ методом проточной цитометрии (день 7-10) позволяет количественно определить концентрацию клеток CD45⁺ CD3⁺ Annexin-V⁻ & DRAQ7⁻.

На третьей стадии изолируют 4×10^9 облученных PBMC (25-50 Гр) с помощью Ficoll (плотность 1,078 г/мл) от нескольких аллогенных доноров (лейкоцитарная пленка, полученная из здоровой донорской крови). Анализ с помощью проточной цитометрии позволяет количественно определить клетки CD45⁺ Annexin-V⁻ и DRAQ7⁻. Микробиологическое исследование облученных PBMC определяет микробный рост.

На четвертой стадии определяют количество TIL, доступное для начала процесса быстрого размножения (день 12). Анализ методом проточной цитометрии позволяет количественно определить клетки CD45⁺ CD3⁺ аннексин-V⁻ и DRAQ7⁻.

На стадии 5 готовят культуральную смесь питающих клеток (облученные фиколл-выделенные PBMC) и добавки для роста в 3 л смешанной Т-клеточной среды, содержащей: от ≥ 3 до $\leq 5 \times 10^9$ облученных PBMC – CD45⁺ Annexin-V⁻ и DRAQ7⁻

клеток, 7-9% человеческой сыворотки АВ, 2000-4000 МЕ/мл IL-2 и 20-40 нг/мл антитела ОКТ-3 в закрытом статическом пакете для культивирования клеток.

На стадии 6 перед добавлением TIL отбирают репрезентативный образец культуральной смеси питающих клеток (облученных фиколл-выделенных PBMC) в контрольную колбу.

На стадии 7 TIL добавляют к культуре REP: от ≥ 1 до $\leq 20 \times 10^6$ полученных из опухоли клеток TIL – CD45⁺ CD3⁺ Annexin-V⁻ и DRAQ7⁻ клеток.

На стадии 8 статическую культуру инкубируют при температуре 35-38,5°C с содержанием диоксида углерода 3,5-6% в сухом инкубаторе в течение 6 дней. Количество и жизнеспособность клеток CD45⁺ Annexin-V⁻ и DRAQ7⁻ оценивают в контрольной колбе (собранный на стадии 6) на 14-й и 18-й день, содержащей смесь REP без TIL, чтобы убедиться, что облученные питающие клетки не размножаются. Анализ с помощью проточной цитометрии позволяет количественно определить CD45⁺ Annexin-V⁻ и DRAQ7⁻ клетки.

На стадии 9 пакет биореактора WAVE предварительно кондиционируют в течение 1-2 часов при температуре 35-38,5°C с 3,5-6% диоксида углерода с 1,7 л TCM с добавлением: 7-9% человеческой сыворотки АВ и 2000-4000 МЕ/мл IL-2.

На стадии 10 TIL переносят и размножают в биореакторной системе WAVE.

На стадии 11 подсоединяют 10 л пакет, содержащий перфузионную подпитку 1 х TCM с добавлением 2000-4000 МЕ/мл IL-2.

На стадии 12 (дни 19-22) регулируют скорость перфузии в дни 19-22.

На стадии 13 (день 24) перфузию останавливают, а отходы и подпитку отключают.

На стадии 14 TIL концентрируют и промывают.

На стадии 15 окончательное составление лекарственного средства проводят с клетками, суспендированными в PBS, содержащем 10% DMSO и 8,5% HSA, в общем объеме 125-270 мл пакета для трансфузии.

На стадии 16 из пакета с конечным продуктом, содержащим TIL, берут образец для анализа QC (контроля качества) и контрольные образцы. Анализы QC свежего лекарственного средства включают микробиологическое исследование, а также тестирование на окрашенные и видимые частицы. Контрольные образцы готовят для определения дозы клеток, фенотипа, жизнеспособности и активности; микробиологических исследований и анализа на эндотоксины.

На стадии 17 контейнер с конечным продуктом маркируют и накладывают на него этикетку конечного продукта.

На стадии 18 проводят криоконсервацию путем замораживания с регулируемой скоростью при скорости замораживания от $-1^{\circ}\text{C}/\text{минуту}$ до -60°C и перенос в условия хранения при $\leq -130^{\circ}\text{C}$. Анализы QC для криоконсервированного лекарственного препарата включают тестирование микоплазмы с помощью qPCR (количественной ПЦР), тестирование дозы Т-клеток и жизнеспособности, тестирование на эндотоксин, измеряемое с помощью кинетического хромогенного LAL-теста, и тестирование активности для оценки CD2⁺. Экспрессия CD45⁺ DRAQ7⁻ для комбинации CD137⁺, IFN- γ ⁺, TNF α ⁺ или CD107a⁺ после совместного культивирования с клеточной линией, экспрессирующей анти-CD3 фрагмент.

Таблица 1 - Обзор изготовления только с использованием статических культуральных пакетов				
СТУ - TIL # (Пол)	Извлеченные из опухоли TIL после первого размножения ($\times 10^7$)	Жизнеспособные CD3 ⁺ клетки после второго размножения ($\times 10^7$)	Кратность размножения*	Жизнеспособные CD3 ⁺ ($\times 10^{10}$) в конечном варианте
1 (Ж)	2,1	1,5	690	1,0
3 (М)	3,8	2,0	1100	2,2
5 (М)	8,2	1,5	1281	2,0
Среднее \pm SD	6,0 \pm 2,2	1,7 \pm 0,23	1023 \pm 303	1,7 \pm 0,52
* - Равно конечным изготовленным TIL / TIL, используемым в REP				

Таблица 2 - Обзор изготовления с использованием перфузионного биореактора				
СТУ - TIL # (Пол)	Извлеченные из опухоли TIL после первого размножения ($\times 10^7$)	Жизнеспособные клетки CD3 ⁺ после второго размножения ($\times 10^7$)	Кратность размножения*	Жизнеспособные CD3 ⁺ ($\times 10^{10}$) в конечном варианте
12 (Ж)	5,4	2,0	1600	3,2
13 (М)	14,0	2,0	1010	2,02
14 (М)	5,8	2,0	2100	4,2
15(М)	5,1	2,0	3100	6,2
16 (М)	3,0	1,8	3000	5,4
19 (М)	7,6	2,0	3400	6,8

20 (М)	1,4	1,1	5409	5,95
21 (Ж)	1,4	1,4	3646	4,85
27(М)	5,1	2,0	1845	3,69
28 (Ж)	8,9	2,0	1590	3,18
32 (Ж)	34,0	2,0	1835	3,67
32 (Ж)	N/A **	2,0	1985	3,97
35 (М)	8,6	2,0	3125	6,25
36 (М)	3,2	1,6	2050	3,28
37 (Ж)	4,0	2,0	1265	2,53
38 (М)	0,55	0,32	3969	1,27
39 (М)	0,83	0,83	1398	1,16
40 (Ж)	1,4	0,71	7444	5,3
41 (М)	9,0	2,0	1555	3,11
42 (М)	9,8	2,0	1965	3,93
43 (Ж)	25,0	2,0	2310	4,62
47 (Ж)	2,67	2,0	1450	2,9
48 (Ж)	2,73	2,0	1865	3,73
51 (М)	4,1	2,0	1780	3,56
54 (М)	27,5	2,0	395	7,9
57 (М)	2,3	1,5	764	1,13
60 (Ж)	3,1	1,1	1486	1,56
63 (М)	0,84	0,89	5842	5,24
64 (М)	0,72	0,72	2993	2,14
67 (М)	0,38	0,37	7526	2,82
Среднее±SD	6,61±8,2	1,56±0,61	2650±1770	3,52±1,69
* - Равно конечным изготовленным TIL / TIL, используемым в REP				
** - Пациент дважды получал лечение с использованием TIL, полученных из собственной опухоли				

Настоящее изобретение обеспечивает систему или устройство для дезагрегации. В некоторых вариантах осуществления устройство для дезагрегации выполнено в виде сминающего устройства для дезагрегации ткани на отдельные клетки или скопления клеток. В некоторых вариантах осуществления дезагрегирующее устройство обеспечивает температурный контроль во время процесса дезагрегации. В некоторых

вариантах осуществления изобретение обеспечивает систему или устройство для криоконсервации. В некоторых вариантах осуществления предусмотрено устройство для дезагрегации и криоконсервации, а также предусмотрен температурный контроль. В другом аспекте изобретение обеспечивает один или несколько гибких контейнеров или систему, содержащую множество контейнеров, содержащую один или несколько гибких контейнеров, приспособленных для дезагрегации, криоконсервации или как дезагрегации, так и криоконсервации в системе дезагрегации/криоконсервации или устройстве по изобретению. В некоторых вариантах осуществления один или несколько контейнеров или множество контейнеров соединены между собой и подходят для использования в закрытой системе. Вышеупомянутые аспекты представлены в прилагаемой формуле изобретения. Дополнительные преимущества и выгоды настоящего изобретения станут очевидны специалисту в данной области после ознакомления с подробным описанием, приведенным ниже, в котором представлены примеры по изобретению.

В некоторых вариантах осуществления дезагрегатор содержит одну или несколько подвижных поверхностей, например, пластин и/или лопастей, и предназначен для приложения сил сжатия и сдвига к образцу ткани. В одном варианте осуществления дезагрегатор содержит первую поверхность и вторую поверхность, которые могут перемещаться относительно друг друга. В некоторых вариантах осуществления поверхности представляют собой противоположные поверхности, предназначенные для приложения давления к образцу. В одном варианте осуществления по меньшей мере одна из поверхностей перемещается в направлении, перпендикулярном направлению поверхностей, чтобы прилагать давление на образец. В одном варианте осуществления поверхности выровнены параллельно и сконструированы таким образом, чтобы перемещаться вместе и раздвигаться повторяющимся или циклическим образом, так чтобы образец многократно сжимается, а затем расслабляется между поверхностями циклическим образом. В вариантах осуществления изобретения сжатие и расслабление образца приводит к срезающим усилиям в образце.

В одном варианте осуществления одна из первой и второй поверхностей удерживается неподвижно, в то время как другая поверхность перемещается. В другом варианте осуществления перемещаются как первая, так и вторая поверхности. В одном варианте осуществления образец ткани содержится в гибком и/или эластичном контейнере, который содержит образец ткани и необязательно дезагрегирующую

жидкость или раствор. В некоторых вариантах осуществления контейнер приспособливается к изменениям объема между первой и второй поверхностями по мере перемещения поверхностей. В некоторых вариантах осуществления контейнер является эластичным и удерживает образец ткани и дезагрегационную жидкость в пределах протяженности противоположных поверхностей. В некоторых вариантах осуществления контейнер является гибким, и окружающее давление воздуха способствует удержанию образца ткани и жидкости для дезагрегации в пределах протяженности противоположных поверхностей. В некоторых вариантах осуществления давление воздуха представляет собой давление окружающей среды. В некоторых вариантах осуществления в закрытой камере применяется давление воздуха, превышающее давление окружающей среды.

В некоторых вариантах осуществления устройство для дезагрегации содержит два или более набора противоположных поверхностей, расположенных бок о бок. В некоторых таких вариантах осуществления одна поверхность является общей для наборов, например, одна пластина, необязательно удерживаемая неподвижно, в то время как вторые поверхности каждого набора расположены бок о бок и прилагают давление на неподвижную пластину. Вторые поверхности могут попеременно прилагать давление при сминающем движении. В некоторых таких вариантах осуществления используется гибкий контейнер, который удерживает образец ткани и жидкость для дезагрегации в пространстве между неподвижной поверхностью и подвижными поверхностями, позволяя содержимому контейнера течь вперед и назад между подвижными поверхностями. В некоторых вариантах осуществления контейнер адаптирован для ограничения или предотвращения такого возвратно-поступательного движения содержимого. В одном варианте осуществления уплотнение поперек контейнера блокирует поток содержимого с одной стороны на другую. В другом варианте осуществления перегородка поперек контейнера ограничивает поток содержимого с одной стороны на другую.

Сминающие поверхности могут приводиться в действие с помощью любого подходящего механизма. Раскрытое в настоящем документе устройство 100 представляет собой пример системы поперечных пластин, предназначенной для попеременного перемещения сминающих поверхностей относительно гибкого контейнера. Сминающие поверхности снабжены пружинами, причем пружины предназначены для придавливания сминающих поверхностей к контейнеру, позволяя при этом изменять толщину контейнера и размер частиц в контейнере. В некоторых

вариантах осуществления пружины установлены с предварительным напряжением. Также раскрытое в настоящем документе устройство 200 является примером конструкции с кулачковым приводом, которая имеет две сминающие поверхности. В устройстве 200 пружины с предварительным напряжением прижимают сминающие поверхности к гибкому контейнеру, и кулачковый механизм циклически поднимает одну сминающую поверхность, а затем другую в направлении от гибкого контейнера. В другом варианте осуществления одно или несколько качающихся рычагов или коромысел используются для подъема сминающих поверхностей в сторону от контейнера. В еще одном варианте осуществления сминающие поверхности поднимаются и опускаются гидравлически. В еще одном варианте осуществления сминающие поверхности поднимаются и опускаются пневматически. В то время как в устройстве 200 имеются две сминающие поверхности, попеременно контактирующие с контейнером для дезагрегации, в некоторых вариантах осуществления приводной механизм позволяет всем подвижным поверхностям прилагать давление одновременно, в том числе, когда система находится в состоянии покоя. Такая функция полезна для очистки содержимого контейнера для дезагрегации в конце процесса дезагрегации. Например, вместо того, чтобы сминающие поверхности располагались в промежуточных положениях или одна была поднята, а другая опущена, все сминающие поверхности опускаются к контейнеру для дезагрегации, продавливая его содержимое через прикрепленную трубку, необязательно фильтрующую, во вторичный приемный контейнер, например, контейнер для криоконсервации.

В полностью закрытой системе дезагрегации и криоконсервации, приведенной в качестве примера в настоящем документе, характерна автоматизированная дезагрегация с последующей ручной фильтрацией и переносом с помощью герметичной системы шприцев и трубок в контейнер для криоконсервации и автоматизированной криоконсервации. Преимущественно, в то время как дезагрегированная опухолевая ткань вручную переносится из контейнера для дезагрегации в контейнер для криоконсервации, стадии дезагрегации и криоконсервации выполняются одним и тем же автоматизированным устройством, запрограммированным на последовательное управление обоими стадиями. В других вариантах осуществления процедура дезагрегации разработана таким образом, что по завершении дезагрегированные опухолевые ткани автоматически перемещаются из контейнера для дезагрегации в контейнер для криоконсервации. В некоторых вариантах осуществления перистальтический насос и клапаны, контактирующие с

соединительными трубками, регулируют поток содержимого. В некоторых вариантах осуществления сминающие поверхности дезагрегатора предназначены для выталкивания или продавливания раствора дезагрегированной опухоли из контейнера для дезагрегации, необязательно через фильтр, в контейнер для криоконсервации, при этом клапаны контролируют поток содержимого. В таких вариантах осуществления дезагрегация и криоконсервация вместе с любым переносом материала в закрытой системе предпочтительно контролируются и выполняются с помощью того же устройства, приведенного в настоящем документе в качестве примера.

Несколько систем дезагрегации были протестированы и оптимизированы в отношении переменных, включая силу, время расщепления и скорость (об/мин или число циклов в минуту). Результаты и прогнозы с использованием нескольких типов тканей были определены для комбинаций переменных силы, времени и скорости, включая силы до 60 Н и выше, время расщепления до 60 минут и выше и скорости до 240 об/мин и выше. В некоторых вариантах осуществления изобретения сила составляет 20-200 Н или 30-120 Н, или 30-90 Н, или 40-60 Н, или 10-20 Н, или 20-30 Н, или 30-40 Н, или 40-50 Н, или 40-45 Н, или 45-50 Н, или 50-55 Н, или 55-60 Н, или 60-65 Н, или 65-70 Н, или 70-75 Н, или 75-80 Н. Типичные сминающие поверхности имеют площадь поверхности примерно 20-50 см². При площади сминающей поверхности 30 см² сминающее давление составляет 0,5-6,5 Н/см² или 1-4 Н/см², или 1-3 Н/см², или 1-2 Н/см², или 1,5-2,5 Н/см², или 2-3 Н/см², или 2,5-3,5 Н/см², или 1,5 Н/см² ± 0,5 Н/см², или 2 Н/см² ± 0,5 Н/см², или 2,5 Н/см² ± 0,5 Н/см², или 3 Н/см² ± 0,5 Н/см², или 4 Н/см² ± 0,5 Н/см², или 5 Н/см² ± 0,5 Н/см². Номинальное давление можно измерить с помощью датчика давления, предпочтительно с поправкой на толщину контейнера для дезагрегации. В некоторых вариантах осуществления устройство для дезагрегации включает датчик давления. В некоторых вариантах осуществления изобретения время расщепления составляет 90 мин или менее, или 75 мин или менее, или 60 мин или менее, или 50 мин или менее, или 5-120 мин, или 15-100 мин, или 30-90 мин, или 40-60 мин, или 5-10 мин, или 10-20 мин, или 20-30 мин, или 30-40 мин, или 40-45 мин, или 45-50 мин, или 50-60 мин, или 60-65 мин, или 65-70 мин, или 40 мин ± 5 мин, или 45 мин ± 5 мин, или 50 мин ± 5 мин, или 55 мин ± 5 мин, или 60 мин ± 5 мин, или 65 мин ± 5 мин, или 70 мин ± 5 мин. В некоторых вариантах осуществления устройство для дезагрегации работает со скоростью 60-360 об/мин или 120-340 об/мин, или 180-300 об/мин, или 210-270 об/мин, 80-160 об/мин, или 120-200 об/мин, или 160-240 об/мин, или 200-280 об/мин, или 240-320 об/мин, или 280-360 об/мин, или 60

об/мин \pm 20 об/мин, или 80 об/мин \pm 20 об/мин, или 100 об/мин \pm 20 об/мин, или 120 об/мин \pm 20 об/мин, или 140 об/мин \pm 20 об/мин, или 160 об/мин \pm 20 об/мин, или 180 об/мин \pm 20 об/мин, или 200 об/мин \pm 20 об/мин, или 220 об/мин \pm 20 об/мин, или 240 об/мин \pm 20 об/мин, или 260 об/мин \pm 20 об/мин, или 280 об/мин \pm 20 об/мин, или 300 об/мин \pm 20 об/мин, или 320 об/мин \pm 20 об/мин, или 340 об/мин \pm 20 об/мин, или 360 об/мин \pm 20 об/мин.

В некоторых вариантах осуществления физическая дезагрегация является непрерывной. В некоторых вариантах осуществления физическая дезагрегация является периодической или эпизодической. Например, когда в образце для дезагрегации наблюдается повышение температуры, может быть выгодно ненадолго замедлить или остановить физическую дезагрегацию, чтобы уменьшить или предотвратить повышение температуры или позволить температуре уравниваться до заданного значения. Не ограничиваясь какой-либо теорией, повышение температуры может происходить в результате физических манипуляций с образцом с помощью устройства для дезагрегации, передачи тепла от активного сминающего механизма устройства, уменьшения физического контакта или передачи тепла от образца к холодильной установке, в то время как процесс дезагрегации является активным, или по другой причине. В некоторых вариантах осуществления периодическая или эпизодическая дезагрегация может быть полезной для устройства для дезагрегации. В раскрытом в настоящем документе устройстве с кулачковым приводом ожидаемый срок службы кулачкового механизма может быть увеличен за счет периодического изменения направления вращения кулачка время от времени, таким образом продлевая срок службы кулачка за счет распределения износа по обеим сторонам кулачка. В вариантах осуществления изобретения периоды активности физической дезагрегации включают, но без ограничения, 15-30 сек, 20-40 сек, 30-60 сек, 45-75 сек, 60-90 сек, по меньшей мере 20 сек, по меньшей мере 30 сек, по меньшей мере 40 сек, по меньшей мере 1 мин, по меньшей мере 1,5 мин или по меньшей мере 2 мин. Продолжительность отсутствия активности может составлять, но без ограничения, 1-10 сек, 10-20 сек, 20-30 сек, 30-40 сек, 40-60 сек, 5 сек, 10 сек, 20 сек, 30 сек, 40 сек, 60 сек, 90 сек, 120 сек или продолжительность в указанных пределах. Продолжительность отсутствия активности может быть настолько короткой, насколько это необходимо для изменения направления в устройстве для дезагрегации.

В некоторых вариантах осуществления поверхности представляют собой противоположные поверхности, выполненные с возможностью латерального

перемещения по отношению друг к другу. В некоторых таких вариантах осуществления латеральное движение включает линейное латеральное движение. В некоторых таких вариантах осуществления латеральное движение включает орбитальное латеральное движение. В определенном варианте осуществления имеется как линейное, так и орбитальное латеральное движение.

В одном варианте осуществления противоположные поверхности являются плоскими. В одном варианте осуществления по меньшей мере одна из поверхностей содержит выпуклую область и выполнена с возможностью качательного движения относительно другой поверхности. Одним из аспектов выпуклой поверхности и качательного движения является создание действия, подобного перистальтике.

В соответствии с изобретением движение поверхностей является контролируемым, причем такой контроль включает контроль одного или нескольких аспектов движения поверхности, включая, но без ограничения, скорость, сжатие образца, давление в системе, продолжительность и частоту циклов. В некоторых вариантах осуществления один или несколько аспектов движения пластин являются постоянными. В некоторых вариантах осуществления один или несколько аспектов движения пластин зависят от состояния дезагрегации. В некоторых вариантах осуществления состояние дезагрегации определяется временем процедуры дезагрегации, такой как, например, одна или несколько предварительно определенных стадий, таких как ранний, средний, поздний или более точные периоды времени, измеряемые в часах, минутах и секундах. В некоторых вариантах осуществления состояние дезагрегации определяется распределением по размерам кусочков опухоли. Например, в одном варианте осуществления изобретения давление увеличивается по мере уменьшения размера кусочков опухоли.

Примеры устройств для дезагрегации и альтернативных вариантов

Ссылаясь на ФИГ. 41, показано сминающее устройство 100 для дезагрегации ткани на отдельные клетки или скопления клеток внутри закрытого и по меньшей мере первоначально асептического, обычно плоского и относительно тонкого пакета-контейнера 10 для образцов. Устройство включает корпус 110, образованный из набора частей, которые могут быть съемно вставлены в устройство с регулируемой температурой, такое как морозильник, размораживатель или нагреватель с регулируемой скоростью изменения температуры, например, имеющийся в продаже морозильник, известный как Via Freeze™, или любое другое устройство, обеспечивающее регулируемую скорость изменения температуры, показанное

схематически на ФИГ. 41 и в целом описывается в настоящем документе как морозильная камера 40. На практике корпус будет включать крышку, которая не показана. При использовании устройство и пакет представляют собой закрытую систему для дезагрегации ткани, например, иссеченных опухолей, частей иссеченных опухолей или игольных биоптатов и т.д., и затем криоконсервации полученной клеточной суспензии для последующего анализа без необходимости переноса дезагрегированного образца из пакета 10.

Корпус 110 имеет шасси 112, к которому прикреплен блок 114 двигателя, который включает электродвигатель и редуктор, который имеет выходную скорость 10-300 об/мин. Выходной вал двигателя и редуктора 114 имеет кривошип 116, который приводит в движение шатун 118, который, в свою очередь, шарнирно соединен с механизмом 120 сдавливания, который будет перемещаться в течение одного цикла сдавливания при каждом обороте кривошипа 116, т.е. цикл сдавливания составляет от 0,2 до 6 секунд. В частности, этот механизм сдавливания имеет параллелограммный четырехзвенный рычажный механизм, который включает два расположенных на определенном расстоянии друг от друга шарнира 122 и 124, жестко закрепленных на шасси 112, которые шарнирно прикреплены к двум противоположным параллельным горизонтальным перекладинам 126 и 128, соответственно. Каждая из горизонтальных перекладин имеет две параллельные сдавливающие перекладины 130 и 132, шарнирно соединенные с ними по одной с каждой стороны от шарниров 122 и 124, вместе образуя параллелограммную связь. Шатун 118 удобно закреплен с возможностью поворота на удлинении верхней горизонтальной планки, так что перемещение этого удлинения вызывает циклическое движение вверх и вниз (в показанной ориентации) сдавливающих планок 130 и 132. К каждой сдавливающей планке 130 и 132 подсоединен узел основания 134 и 136, который, за счет упомянутого выше циклического движения будет последовательно двигаться вверх и вниз при движении кривошипа 116, т.е. когда одно основание поднимается, другое будет опускаться, и наоборот.

Каждый из узлов основания 134 и 136 включает плоскую пластину 138 и 140, при этом каждая пластина прикреплена с помощью пружин к верхней раме 142 и 144 основания, соответственно, с помощью спиральных металлических пружин 146. В описанной выше конструкции или эквивалентной компоновке, при ее использовании, пружины 146 установлены с предварительным напряжением. В этом случае суммарное предварительное напряжение предпочтительно составляет 40-80 Н, более

предпочтительно 30-70 Н на каждое основание, предпочтительно примерно 60 Н. Суммарная жесткость пружины составляет 1-5 Н на мм хода, предпочтительно примерно 3 Н на мм, и предполагаемый ход основания составляет примерно 8-12 мм, предпочтительно примерно 10 мм. Кроме того, предполагается, что площадь поверхности каждого основания составляет примерно 20-50 см², предпочтительно примерно 35 см². Это приводит к условному давлению на пакет от нуля (когда основание отрывается от пакета или практически не имеет нагрузки) и примерно до 6 Н/см² (примерно 9 psi (фунтов на кв. дюйм)). Предпочтительное условное давление составляет примерно 2 Н/см² (примерно 3 psi). Однако, учитывая, что пакет может не содержать, по меньшей мере в начале процесса сдавливания, однородного материала, будут присутствовать комки материала, где будет сосредоточена приложенная сила, и поэтому давление описывается как «условное», которое представляет собой идеализированную ситуацию, например, для обеспечения минимального сопротивления давлению пакета 10, оказываемого в конце процесса сдавливания.

В нижней части шасси расположена приемная зона 148 для гибкого пакета 10, а рядом с приемной зоной 148 находится теплопередающая пластина 150. Площадь 148 является достаточно большой для вмещения пакета 10 для обработки образцов, который можно натянуть на пластину 150 через переднюю часть шасси (передняя часть показана на фиг. 41). Пластина включает верхнюю поверхность 151, на которой одет пакет 10, и нижнюю поверхность 152, которая при использовании подвергается воздействию нагревания или охлаждения извне. Верхняя поверхность 151 в целом параллельна опорным пластинам 138 и 140 каждого основания, так что опорные пластины перемещаются в основном параллельно поверхности 151. Иными словами, плоские опорные пластины перемещаются в основном перпендикулярно поверхности 151, что предотвращает воздействие значительных боковых сил на механизм 120. Пластина 150 выполнена из металла, предпочтительно из алюминия, или меди, или золота, или серебра, или сплавов, содержащих эти металлы. Теплопроводность предпочтительно составляет выше 100 и более предпочтительно выше 200 Вт/м·К, измеренная при 20 градусах Цельсия. Толщина материала пластины 150 составляет примерно 3 мм или меньше и обеспечивает низкую тепловую массу и, таким образом, более быструю реакцию содержимого пакета 10 на изменения температуры на противоположной стороне пластины.

Со ссылкой дополнительно на ФИГ. 42 и 43, устройство приводится в действие путем подачи электрического тока на блок двигателя 114 для приведения в действие

кривошипа 116, в данном примере по часовой стрелке, как показано стрелками С. Кривошип заставляет шатун 118 приводить в действие описанный выше механизм 120 сдавливания. Следует отметить, что верхняя и нижняя части хода кривошипа, где к механизму 120 приложено максимальное усилие, совпадают с самым нижним положением каждого узла основания 134 и 136. Узлы основания перемещаются вверх и вниз в направлении, указанном стрелками U и D, для последовательного массажа пакета 10 для образцов, таким образом, чтобы содержимое пакета 10 могло сместиться в одну сторону от соответствующего сдавливающего основания. Поскольку потенциально образцы солидной ткани в пакете имеют возможность сдвигаться в сторону от сдавливающего основания, и поскольку опорные пластины 138 и 140 каждого основания снабжены пружинами, основания получают дополнительное упругое перемещение, даже когда они находятся в нижней части их хода, то меньше вероятность того, что механизм заклинит, когда предполагается дезагрегировать более крупные массы тканей. Последовательное продавливание также снижает вероятность разрыва пакета 10.

Фигура 44 представляет собой вид сверху устройства 100, описанного выше, но на этом виде пакет 10 не установлен. В частности, можно видеть относительное расположение узлов основания 134 и 136 рядом друг с другом, которые находятся на определенном расстоянии друг от друга и имеют общую площадь, наблюдаемую в плане, которая примерно равна площади пакета 10 в горизонтальном положении, но разница в площадях, составляющая примерно плюс-минус 10% от площади пакета 10, является применимой.

На ФИГ. 45 показан другой вид в плане устройства 100', аналогичного по конструкции устройству 100, описанному выше, но в этом варианте двигатель 113 узла двигателя 114 расположен поперек выходного вала его редуктора 115 за счет использования редуктора 115 под углом 90 градусов, так что двигатель 113 не выступает за заднюю стенку 111 устройства 100'. Таким образом, это устройство 100' при необходимости может поместиться в морозильную камеру меньшего объема.

Во время вышеупомянутой обработки путем дезагрегации силы, прилагаемые опорными узлами 134 и 136, воздействуют на теплопередающую пластину 150. Это означает, что пакет 10 для проб прижимается к контактной поверхности 151 пластины 150 во время обработки, обеспечивая хороший поверхностный контакт между пакетом для проб 10 и поверхностью 151 пластины и, следовательно, улучшая передачу тепловой энергии.

На ФИГ. 46, 47 и 48 показаны различные варианты осуществления упомянутого выше гибкого пакета 10 для проб. Используемый пакет вставляется в приемную зону 148 в устройстве 100 или 100' и располагается под двумя упомянутыми ножками 134 и 136. Таким образом, пакет имеет в целом плоскую конструкцию толщиной примерно до 12 мм с некоторой дополнительной податливостью для размещения в нем образцов тканей. Как видно из ФИГ. 46, показана одна конструкция пакета 10, состоящего из двух слоев пластикового материала, запечатанного только по их периферии 14 с образованием центральной полости 12 и отверстий 16 для доступа в полость 12. Пакет может быть изготовлен из EVA. При использовании предпочтительно, чтобы отверстия 16, или по меньшей мере одно из них, были достаточно большими, т.е. имели диаметр примерно 10 мм или больше, для приема образца, который, при необходимости, был нарезан на мелкие кусочки и помещен в полость 12 пакета с помощью шприца. Однако также можно предусмотреть так называемый «замок-молния» на конце пакета напротив отверстий, чтобы можно было поместить в пакет большие образцы тканей, а затем пакет снова запечатать. «Застежка-молния» может быть сложена один или несколько раз для образования шва, удерживаться в сложенном виде внутри гибкого канала или с помощью другого зажима или зажимов (не показаны) для уменьшения вероятности утечки. В качестве альтернативы пакет 10 можно открыть и добавить ткань. После этого пакет можно запечатать вместе с его содержимым. Пакет 10 имеет угловые отверстия 18 для размещения пакета в используемом устройстве и удержания ее на месте во время продавливания. Хотя на чертежах показан пакет 10 с одной полостью 12, можно было бы создать пакет, имеющий более одной полости, например, две, три, четыре или пять полостей, например, каждая из множества полостей является удлиненной и имеет изначально открытый запечатываемый конец и запечатываемое отверстие на другом конце для введения реагентов, таких как дезагрегирующий фермент, и для извлечения дезагрегированного образца после завершения или практически полного завершения дезагрегации.

На ФИГ. 47 показан пакет 10 из ФИГ. 46, смонтированный в установочной раме 20 с помощью штифтов 24 на раме, которые входят в угловые отверстия 18. Рама 20 представляет собой альтернативный способ размещения и удержания пакета 10 на месте внутри устройства 100/100'. Рама 20 имеет установочные отверстия 22, которые взаимодействуют с устройством для размещения и удерживания пакета на месте во время продавливания. Рама имеет внутреннее открытое окно 26 с гладкой закругленной внутренней кромкой 23 для размещения полости 12 и продавливающих

ножек 134 и 136 при использовании. Рама 20 облегчает загрузку и выгрузку пакета 10 из устройства 100/100'.

На ФИГ. 48 показан альтернативный вариант рамы 20', который имеет две в целом симметричные половины, каждая из которых аналогична конструкции рамы 20. Каждая половина рамы дополнительно имеет гибкую оболочку 30, отлитую на раме 20', так что две половины соединяются вместе, как раковина моллюска, охватывающая пакет 10. Верхняя и нижняя гибкие оболочки действуют как обвязка, если пакет 10 внутри порвется во время использования. Эта функция особенно полезна для образцов инфицированных тканей.

Еще одна альтернатива, которая не показана, простая конструкция «пакет в пакете» может быть использована для локализации утечек. В еще одном варианте осуществления пакет может включать основание, которое имеет эластичные (по меньшей мере при комнатной температуре) отдельные лунки, так что аликвоты образца можно извлекать без использования всего образца, например, после замораживания, как описано ниже. В качестве альтернативы герметичный пакет может быть дополнительно запаян на части, что позволит отделить образец.

Обработка образца, помещенного в пакет 10, может в одном примере в значительной степени следовать стадиям, описанным в WO 2018/130845. В этом случае запечатанный пакет ТО, содержащий ткань, суспендируют в водном растворе, который может содержать пищеварительные ферменты, такие как коллагеназы и протеазы, для ускорения распада ткани, введенные в пакет через отверстие 16. В этом случае пакет помещают на пластину 150 и нагревают, например, от внешнего источника тепла примерно до 35°C, чтобы увеличить скорость расщепления тканей. Одно из предлагаемых в настоящем документе важных отличий состоит в том, что используется один пакет для обработки образцов, и пищеварительные ферменты могут быть введены через одно из отверстий 16 в пакете до или во время дезагрегации. Теплопередающую пластину 150 можно использовать для подачи тепловой энергии в пакет путем нагревания нижней стороны пластины, чтобы обеспечить желаемую температуру в пакете для ферментативного действия. Это тепло может удобно исходить от нагревательной пластины с электрическим нагревом или от электрических нагревательных элементов внутри или на пластине 150. Величина дезагрегационного действия будет зависеть от множества параметров, например, от размера, плотности и эластичности исходного образца ткани и поэтому время дезагрегации и скорость продавливания будут значительно различаться. Слишком долгое или слишком

интенсивное продавливание может привести к снижению жизнеспособности клеток. Таким образом, важна скорость двигателя и период дезагрегации. Одним из вариантов решения этой проблемы является определение времени обработки в соответствии со справочной таблицей, которая включает время и выходное число оборотов, необходимые для дезагрегирования аналогичных образцов. Другой вариант заключается в измерении мгновенной электрической мощности или электрической энергии в течение времени, необходимого для выполнения процесса дезагрегации, или в измерении силы или напряжения, воздействующего на пластину 150 или другую часть механизма, и остановке после достижения предварительно определенного порога, чтобы указать, что образец был достаточно дезагрегирован. По мере снижения мощности/сил/напряжений дезагрегация приближается к завершению. Другим вариантом является измерение светопоглощения через пакет: чем больше поглощение, тем ближе образец к полной дезагрегации. После завершения дезагрегации содержимое пакета можно перенести, а клетки или другие представляющие интерес компоненты можно отделить и поместить обратно в новый пакет для замораживания в устройстве 100/100'. Альтернативно и предпочтительно весь дезагрегированный материал можно оставить в пакете и устройстве для замораживания. Криопротектор вводится в пакет через отверстие 16.

Еще одно отличие настоящей методики от методики, описанной в WO 2018/130845, заключается в том, что после введения криопротектора устройство с дезагрегированным образцом и криопротектором в пакете монтируется (или остается) в устройстве, и устройство целиком устанавливается в морозильной камере 40, как описано выше. Основание морозильной камеры холодное, поэтому тепловая энергия забирается из пакета 10 через пластину теплопередачи 150. Чтобы контролировать образование льда и предотвратить переохлаждение образца во время охлаждения пакета, его можно массировать ножками 134 и 136, способом, описанным выше, хотя и с меньшей скоростью, чем при дезагрегации, для контроля образования кристаллов льда и, таким образом, повышения жизнеспособности клеток после оттаивания. Электрическая энергия может подаваться к моторному блоку 114 по проволочному проводу для поддержания движения механизма 120 внутри морозильной камеры, т.е. морозильной камеры 40 (ФИГ. 41).

Поскольку устройство вынимается из морозильной камеры, его очистка после использования упрощается.

При необходимости использования, замороженные дезагрегированные образцы в пакете 10 можно быстро разморозить в устройстве 100/100' путем дополнительного внешнего нагревания пластины 150, и/или путем частичного погружения устройства 100/100' в нагретой водяной бане, поддерживаемой при температуре примерно 37°C, и удалении криопротектора. В каждом случае пакет можно массировать во время оттаивания. Если ферменты все еще присутствуют, при необходимости их также можно удалить, например, с помощью фильтрации. Как правило, они практически не влияют на клетки во время криоконсервации, потому что их действие прекращается при низких температурах. Все технологические манипуляции, нагревание, дезагрегация, охлаждение, замораживание и последующее оттаивание происходят с образцом в одном и том же герметичном эластичном пакете 10 и могут быть выполнены в одном устройстве. Это не только экономит время и пространство, но и позволяет одной записью фиксировать все, что происходило с образцом во время обработки, например, температуру, продолжительность, скорость дезагрегации, протокол замораживания, и снижает вероятность ошибок, например, когда образец слишком долго находится в неконтролируемой среде между обрабатывающими машинами.

Более конкретные примеры устройств и методов, используемых при обработке и замораживании образцов тканей, приведены ниже.

На ФИГ. 49 показан пример пакета 10, изготовленного из термопластичного материала, такого как пленка EVA или PVG, и имеющего отверстие 11 для приема образца ткани Т. Пакет включает трубку 13, прикрепленную к одному или нескольким отверстиям 16 (фиг. 46), при этом трубка включает одну или несколько ветвей 17, компрессионные клапаны 19 и стандартные соединители 15 типа Люэра. Показанная единая линия трубки является просто иллюстративной - пакет 10 может включать дополнительные параллельные трубки, соединенные через множество отверстий 16.

Как только ткань Т оказывается внутри пакета 10, отверстие 11 может быть запечатано с помощью механического зажимного уплотнения 9, показанного закрытым и запечатанным на ФИГ. 50, и показанного открытым пунктирными линиями на той же фигуре, и/или с помощью термосварки с использованием машины для термосварки 50, как показано на ФИГ. 51а, с получением термосваренной закрывающей полоски или полосок (например, множества параллельных полосок) 8, причем каждый способ формирует герметичную полость 12 (фиг. 46, 47 и 49).

Альтернативное или дополнительное средство для запечатывания пакета 10 показано на ФИГ. 51b и 51c. Как показано на фиг. 51c, пакет 10 после термосварки на сварном шве 8 может быть зажат в зажиме 60, состоящем из двух частей, который содержит верхнюю планку 62 и нижнюю планку 64, скрепленные вместе парой винтов 66. На фиг. 51b показан зажим 60 в разобранном состоянии, но при использовании винты 66 не обязательно полностью выкручивать из остального зажима перед вставкой пакета 10. Верхняя планка 62 имеет сужающееся углубление 68, в котором находится дополнительный клиновидный элемент 61 при зажатии. Углубление и клин концентрируют зажимные усилия на вершине клина 65, обеспечивая более высокие зажимные усилия на вершине, чем могут быть достигнуты с помощью плоских зажимных поверхностей. Для еще большей зажимной силы вершина 65 имеет небольшой канал 67 на вершине, который при использовании встречается с дополнительным ребристым образованием 69 в верхней планке. В некоторых вариантах осуществления усилия достаточны, чтобы свести на нет необходимость в термосварке 8. В некоторых вариантах осуществления желательна термосварка или другой механизм запайки мешков, например, для обеспечения манипуляций с пакетом, содержащим образец, вне дезагрегатора. В некоторых вариантах осуществления зажимное устройство обеспечивает целостность уплотнения. Зажимное усилие дополнительно увеличивается за счет толщины и жесткости верхней и нижней планки, которые с трудом изгибаются и, таким образом, сохраняют зажимное усилие, создаваемое винтами 66. На фиг. 51c показан зажим 60 в зажатом состоянии. Выступы 63 соответствуют элементам продавливающего устройства 100/100' или 200 (как описано ниже) для предотвращения перемещения зажима и, следовательно, зажатого пакета 10 во время продавливания. Внешняя периферия и высота зажима 60 имеют такие размеры и форму, чтобы соответствовать дополнительной части области 148 приема образца (или 248, фиг. 62 и далее) и, таким образом, обеспечивать дальнейшее расположение зажатого пакета 10 во время продавливания. Хотя это не показано, зажим 60 может также включать дополнительную раму 20, 20', как показано на ФИГ. 47 и 48, и таким образом, чтобы зажим был жестко закреплен на одном конце рамы, а отверстие(я) 16 (фиг. 46 и 49) поддерживались на другом конце рамы.

Ссылаясь на ФИГ. 52, во время использования после запечатывания пищеварительный фермент E можно ввести в полость 12 через трубку 13, например, путем введения фермента в пакет с помощью шприца 5, присоединенного к ответвлению 17. Удерживая пакет в вертикальном положении, воздух может быть

удален из полости 12 путем вытягивания поршня шприца 5, как показано на фиг. 53. Первоначальное смешивание фермента Е и ткани Т можно произвести вручную, как показано на ФИГ. 54.

Затем может быть начата загрузка пакета 10 в устройство для продавливания 100 для дезагрегации либо с рамой 20/20', и с обвязочным покрытием 30, либо без них, как показано на ФИГ. 55.

Затем происходит процесс дезагрегации, как описано выше. После завершения, которое может занять от нескольких минут до нескольких часов, например, от 10 минут до 7 часов, предпочтительно от 40 минут до 1 часа, дезагрегированный сжиженный образец может быть разделен на аликвоты, например, с использованием набора пакетов, описанного выше, и дополнительного пакета 7 для аликвоты образца, как показано на фиг. 56, соединенного с ответвлением 17. В этом случае шприц 5 используется для вытягивания сжиженного образца из пакета 10 в направлении стрелок F, клапаны 19a и 19b открыты, а клапан 19c рядом с пакетом для аликвоты образца 7 закрыт. Как только в шприц 5 набрано достаточное количество образца, клапан 19b закрывается, клапан 19a остается открытым, а клапан 19c открывается. Затем с помощью шприца нагнетают жидкости в направлении стрелки F на фиг. 57 в пакет 7 для аликвотных образцов. Рис. 58. Трубка 13 пакета для аликвот 7 может быть термосварена с помощью зажимной машины для термосварки 55, как показано на фиг. 58. Этот процесс можно повторять до тех пор, пока не будет получено достаточное количество аликвот или пока не закончится образец. Пакет может быть уже частично разделен для упрощения запечатывания каждого отделения.

Как описано выше, пакет 10 для образцов может оставаться в устройстве для продавливания 100 (фиг. 55), и устройство для продавливания затем может быть загружено в устройство для изменения температуры с регулируемой скоростью, в данном случае в морозильную камеру 40, как показано на фиг. 59. Этот метод позволяет продолжать продавливание во время замораживания, чтобы препятствовать образованию кристаллов льда, хотя на практике пакет 10 можно удалить перед замораживанием, и тогда морозильная камера 40 действует только для охлаждения образца через теплопередающую пластину во время продавливания. В качестве альтернативы пакеты 7 для аликвотных образцов могут заменить весь пакет 10 для образцов. В другом альтернативном варианте морозильная камера 40 может быть использована для осторожного охлаждения необработанного или обработанного образца примерно до 4 градусов Цельсия путем монтирования устройства для

продавливания 100 на верхней части морозильной камеры 40 с открытой крышкой, так что основание 150 охлаждается, как показано на фиг. 60. В другом варианте можно удалить основание 150 и поместить его в морозильную камеру с установленной крышкой морозильной камеры, как показано на ФИГ. 61. В еще одном альтернативном варианте, не показанном, пакеты 10 или 7 могут быть заморожены непосредственно в морозильной камере 40.

Изобретение не следует рассматривать как ограниченное вариантами осуществления, описанными выше, но оно может быть изменено в пределах объема прилагаемой формулы изобретения, что очевидно для специалиста в данной области. Например, механизм продавливания, описанный выше, является предпочтительным, поскольку он обеспечивает полностью шарнирные механические взаимосоединения, которые с меньшей вероятностью заклинивают в холодных условиях, чем скользящие поверхности, но этот механизм может быть заменен любым механически эквивалентным средством для последовательного продавливания двух или более опор. Описанные плоские опоры могут быть заменены роликовыми опорами, в которых продавливающее движение происходит из стороны в сторону, а не вверх и вниз. Описываемое продавливание или его механический эквивалент предпочтительно выполняют со скоростью 2 или 3 продавливания на каждый фут в секунду, чтобы оптимизировать дезагрегацию и максимизировать восстановление клеток, и представляет собой устойчивое продавливание, но продавливание для разных типов клеток может быть быстрее или медленнее, или прерывистым.

Поскольку устройство 100/100' предназначено для помещения в морозильную камеру и воздействия чрезвычайно низких температур (например, минус 80 градусов Цельсия или ниже), использование металлических деталей, в частности таких частей, как пружины 146, является предпочтительным, поскольку полимерные детали становятся более жесткими при низких температурах. Кроме того, плотно прилегающие детали, такие как поршни и цилиндры, могут заклинивать или плохо подходить при очень низких температурах, поэтому предпочтительны простые шарнирные соединения, такие как описанный механизм 120.

На ФИГ. 62, 63 и 64 показано альтернативное устройство 200 для продавливания, которое по размеру и функциям аналогично устройству 100, описанному выше. Устройство 200 имеет определенные отличия, которые более подробно описаны ниже.

Ссылаясь на ФИГ. 62, принципиальное различие между устройством 100 и устройством 200 заключается в том, что устройство 200 имеет механизм 220 продавливания, который отличается от механизма 120 устройства 100. Две продавливающие ножки 234, 236 приводятся в циклическое чередующееся продавливающее движение, подобно движению, показанному на ФИГ. 42 и 43, с помощью электродвигателя 24 В DC 213 (фиг. 63), который является частью узла электродвигателя 214, имеющего угловой энкодер, обеспечивающий обратную связь с контроллером 221 (фиг. 63) для мониторинга и управления скоростью продавливающего движения. Двигатель приводит в движение кулачковый вал 224 через зубчатый ремень 222. Кулачковый вал включает пару кулачков 230, 232, смещенных на 180 градусов, в данном случае каждый из которых имеет циклоидальную форму для обеспечения простого гармонического движения кулачкового толкателя. Каждый кулачок функционирует для перемещения узла кулачкового толкателя, включая связанное с ним эластомерное ведомое колесо 225, 227, которое перемещается по профилю кулачка, оси 221, 223 ведомого колеса, передавая усилие на каретку 226, 228 снабженную пружинами толкателя. Каждая каретка 226, 228 скользит по линейной направляющей 229, а соответствующая ножка 234, 236 соединяется с кареткой. Каждый узел по очереди толкается вверх соответствующим одним из ведомых колес по мере того, как он перемещает профиль кулачка от положения продавливания вместе с опорой, когда соответствующий кулачок вращается двигателем против подталкивающей силы возвратной пружины 231. По мере того как кулачок вращается дальше, и профиль кулачка отступает, пружина 231, связанная с каждым узлом толкателя, толкает узел и опору вниз с усилием проталкивания.

Таким образом, усилие продавливания ограничивается коэффициентом жесткости соответствующей пружины 231 узла толкателя, а не мощностью приводного двигателя. 1. Сила, прилагаемая к пакету, во время использования ограничивается пружинами, потому что механизм поднимает ножки вверх, а пружины толкают их обратно вниз. Это гарантирует, что:

- a. двигатель не может заглохнуть (независимо от размера или текстуры опухоли);
- b. образец не сжимается с чрезмерным усилием и пакет не разрывается;
- c. максимальное давление, приложенное к пакету, ниже давления, испытанного при изготовлении пакета; и

d. как описано ниже, шарнирная область 248 для приема пакетов может принимать пакет для образцов и любой используемый зажим без обязательного предварительного позиционирования ножек. Другими словами, ножки могут находиться в любом положении при приеме пакета, потому что шарнирная область 248 для образца закрыта от ножек, и при необходимости любой образец может быть в это время сжат ножками, поскольку шарнирная область закрыта для ножек.

Ссылаясь также на ФИГ. 63 и 64, устройство 200 дополнительно включает гибкую уплотнительную мембрану 241, проходящую от корпуса 210 устройства до верхних частей двух ножек 234, 236, которая обеспечивает водонепроницаемое и пыленепроницаемое уплотнение между подошвами ножек и остальными частями механизма 220 продавливания. Такое расположение препятствует загрязнению механизма в случае разрыва сжатого пакета во время эксплуатации. Хотя мембрана 241 является предпочтительной, ножки могут скользить в уплотнителях, таких как манжетные уплотнители, установленные на перегородке, отделяющей механизм 220 от области 248 пакета, и при необходимости достигается аналогичное предотвращение загрязнения механизма.

Устройство 200 дополнительно включает теплопередающую пластину 250, которая выполняет ту же функцию, что и теплопередающая пластина 150. Эта пластина 250, однако, шарнирно прикреплена к одной стороне корпуса шарниром 255 (фиг. 64), так что вставка и извлечение пакета, подлежащего прохождению (как показано на фиг. 46, 47 и 48), упрощается. Теплопередающая пластина 250 включает датчик 256 температуры, который позволяет контролировать и регистрировать температуру пластины 250 и области 248 приема пакетов контроллером для контроля качества. Пластина 250 имеет первую и вторую поверхности 251 и 252 с той же функцией, что и поверхности 151 и 152, описанные выше.

Каждая ножка регулируется по высоте относительно теплопередающей пластины 250 устройства 200, и индикация ее перемещения контролируется также контроллером. Таким образом, даже если поворотный энкодер может показывать, что двигатель вращается, механическая неисправность, такая как отказ зубчатого ремня 222, все же может быть обнаружено контроллером, и может быть реализовано соответствующее действие, например, подача аварийного сигнала.

Устройство 200 имеет те же внешние размеры, что и устройство 100, а корпус 210 устройства предназначен для перемещения внутри морозильной камеры 40 с

регулируемой скоростью с крышкой морозильной камеры, как описано выше и показано на ФИГ. 61.

Для удобства для описания изобретения, показанного на чертежах, использовались такие термины, как верхнее, нижнее, вверх и вниз, а также более описательные термины, такие как ножки, продавливать и продавливание, но на практике показанное устройство может быть ориентировано любым образом, так что эти термины становятся, например, измененными на обратные или менее описательными в этой новой ориентации. Следовательно, никакие ограничения в отношении ориентации не должны истолковываться такими терминами или эквивалентными терминами.

Изобретение обеспечивает устройство (100/100') для дезагрегации образцов ткани на отдельные клетки или клеточные скопления в закрытом гибком пакете (10), при этом устройство включает механизм механической дезагрегации (120) и область приема пакета с образцом ткани (148), при этом указанное устройство дополнительно включает теплопередающую пластину (150) для передачи тепловой энергии в область (148) или из нее, при этом пластина имеет первую поверхность пластины (151), примыкающую к области (148), и противоположную поверхность (152), подвергающуюся внешнему тепловому воздействию, обращенную в сторону от области (148).

Криоконсервация опухолевой ткани во время сбора привела к возможности отделить изготовление от сбора опухоли. Это означает, что изготовление UTP можно планировать и выполнять как единый производственный процесс, начиная с размораживания продукта расщепления опухоли и заканчивая промывкой конечного сбора TP, составлением лекарственного препарата, наполнением, маркировкой и криоконсервацией.

Криоконсервация конечного продукта позволила все испытания для выпуска лекарственного средства, подлежащие выполнению перед кондиционирующей химиотерапией и лечением пациента, исключить производства конечного продукта.

Проточную цитометрию использовали для характеристики и количественного определения изготовленных продуктов. TILd определяются как T-клетки, экспрессирующие маркер клеточной поверхности CD3, которые были культивированы из метастатических опухолей путем оценки патологии репрезентативного образца исходного материала. Жизнеспособность основана на проценте всех клеток CD3⁺, которые не связываются с маркером ранней клеточной гибели Аннексином-V и/или

красителем для анализа жизнеспособности DRAQ7 (эквивалентным трипановому синему или PI). Чистота определяется как процент жизнеспособных Т-клеток (CD3+, Annexin-V^{-ve} и DRAQ7^{-ve}) в популяции жизнеспособных гемопоэтических клеток (CD45+, Annexin-V^{-ve} и DRAQ7^{-ve}).

Подавляющее большинство клеток до применения протокола быстрого размножения (REP) представляют собой Т-клетки, экспрессирующие CD3. В исследовательских, а также клинических партиях наблюдается переменное распределение CD3+CD8+ и CD3+CD4+ TIL, и они будут состоять из подмножества, содержащего опухоль-реактивные клетки. Поскольку TIL размножаются в REP с анти-CD3, конечный продукт содержит почти исключительно жизнеспособные CD3+ Т-клетки (>94%).

Теоретически конечный продукт все еще может содержать опухолевые клетки, хотя это очень маловероятно из-за условий культивирования, которые сильно и избирательно способствуют росту Т-клеток и опосредованному Т-клетками уничтожению опухолевых клеток. Клинические данные нескольких сотен инфузий TIL цитологически не показали наличия опухолевых клеток. Чтобы сопоставить данные и в конечном итоге установить спецификацию, был включен тест для выявления всего жизнеспособного клеточного материала, который не является гемопоэтическим по происхождению, анализ ИРС, а также тест на частоту биомаркеров рака.

Клеточный лекарственный продукт TIL представляет собой суспензию приблизительно в 125-270 мл забуференного изотонического солевого раствора, содержащую 8,5% сывороточного альбумина человека и 10% DMSO. Количество присутствующих клеток зависит от способности клеток TIL каждого человека размножаться в культуре в сочетании с условиями культивирования и воспроизводимостью производства.

Таблица 3 – Иллюстративная композиция лекарственного продукта		
Компонент	Кол-во (на инфузионный пакет)	Функция
Т-клетки, полученные из опухоли	5x10 ⁹ -5x10 ¹⁰ CD45 ⁺ , CD3 ⁺ , Annexin-V ⁻ , DRAQ7 ⁻ клетки	Активные
20% человеческий сывороточный альбумин	8,5% HSA масс./об.	Ингибитор абсорбции
Фосфатно-буфеный солевой раствор	125-270 мл	Изотонический разбавитель
DMSO	10% объ/об.	Криопротектор

Ссылаясь на ФИГ. 1, раскрыт модуль дезагрегации устройства. Устройство может содержать гибкий контейнер **1a** для дезагрегации и расщепления в варианте осуществления, включающем ферментативное расщепление. Открытый конец **1b** позволяет переносить материал ткани солидной опухоли в контейнер **1a**. Отверстия **1c** для подвешивания позволяют подвешивать контейнер **1a** и поддерживать его во время транспортировки или использования. Для поддержания асептических условий устройства целевое место сварки **1d** позволяет запечатывать контейнер **1a** с помощью сварочного аппарата **13c** или другого аналогичного средства. Контейнер **1a** может иметь закругленные края **1e** на внутренних поверхностях контейнера **1a** для уменьшения потерь, которые могут возникнуть как часть перехода к примерам, проиллюстрированным на ФИГ. 2a-c или ФИГ. 3a, или ФИГ. 3b. Трубка **1f** позволяет переносить среду **3a** в контейнер **1a** через стерильный фильтр **2a**. Стерильный фильтр **2a** содержит иглу, позволяющую проколоть уплотнение в последующем модуле для облегчения переноса среды **3a**. Трубка **1g** позволяет переносить пищеварительные ферменты **3b** в контейнер **1a** через стерильный фильтр **2b**. Стерильный фильтр **2b** содержит иглу, позволяющую проколоть уплотнение для облегчения переноса пищеварительных ферментов **3b** в контейнер **1a**. После дезагрегации ткани солидной опухоли, особенно с участием ферментативного расщепления, дезагрегированную смесь выводят из трубки **1h** через фильтрующую установку **4a**, содержащую стерильный фильтр **4b**, до входа в фазу инкубации. Фильтрующий блок **4a** может быть гибким, чтобы допустить скручивание, не влияя на полезность процесса фильтрации. Фильтр **4b** удаляет недезагрегированную ткань. Зажим **5a** трубки позволяет среде **3a** поступать в гибкий контейнер **1a** через стерильный фильтр **2a**. В варианте осуществления, включающем ферментативное расщепление, зажим **5b** трубки позволяет ферментам **3b** поступать в гибкий контейнер **1a** через стерильный фильтр **2b**. Зажим трубки **5c** позволяет содержимому гибкого контейнера **1a** проходить через фильтрующий блок **4a** в один или несколько примеров, показанных на ФИГ. 2a-c или ФИГ. 3a или ФИГ. 3b.

Согласно ФИГ. 2a, стерильный фильтр **2c** позволяет вводить среду **3a** и/или раствор для замораживания **3c**, необходимые для криоконсервации дезагрегированной опухолевой ткани. Фильтр **4d** может потребоваться для дополнительного разделения по размеру скоплений клеток/тканей. Фильтр **4d** заключен в фильтрующий блок **4c**, который может быть гибким, чтобы допускать скручивание, не влияя на полезность

процесса фильтрации. В одном варианте осуществления может потребоваться фильтр **4e** для удержания клеток, но позволяющий вымывать среду и клеточные фрагменты. Фильтр **4d** аналогичным образом заключен внутри фильтрующего блока **4c**. В одном варианте осуществления зажим **5d** трубок предназначен для предотвращения возврата материала из контейнера **1a**, прошедшего через фильтрующие блоки **4a** и **4c**, обратно в контейнер **1a**. В одном варианте осуществления зажим трубки **5e** предназначен для того, чтобы позволить отходам из контейнера **1a**, прошедшим через фильтрующие блоки **4a**, **4c** и **4e**, попасть в контейнер для отходов **6a**, но предотвратить попадание среды **3a** или **3c** через стерильный фильтр **2c**. Зажимы для трубок **5f** не позволяют материалу из контейнера **1a**, прошедшему через фильтрующие блоки **4a**, **4c** и **4e**, вернуться к источнику среды **3a** или **3c** или попасть в один из примеров, показанных на фиг. 3a или фиг. 3b до того, как отходы попадут в контейнер **6a** для отходов через зажим трубки **5e**. После истощения отходов зажимы трубок **5e** и **5d** закрываются, и зажимы трубок **5f** позволяют средам **3a** или **3c** переносить клетки внутри фильтра **4e** в один из примеров, показанных на фиг. 3a или фиг. 3b. Контейнер **6a** для отходов имеет отверстия для подвешивания для поддержки контейнера **6a** для отходов во время использования и/или транспортировки.

На ФИГ. 2b показан модуль обогащения устройства. Зажим трубки **5g** позволяет содержимому контейнера **1a** попадать в гибкий контейнер **7a** модуля обогащения через блок фильтров **4a**. Зажим трубки **5h** позволяет содержимому контейнера **7a** проходить через блок фильтра **8a**, задерживая и обогащая клетки, при этом позволяя отходам и дебрису проходить через фильтр **8b** в контейнер для отходов **6a** с давлением, регулируемым клапаном **8c**, прежде чем обогащенные клетки вернутся в контейнер **7a** через открытый зажим трубки **5i**. Зажим трубки **5i** позволяет содержимому контейнера **7a** через открытый зажим трубки **5h** проходить через блок фильтров **8a**, удерживая и обогащая клетки, позволяя отходам и дебрису проходить через фильтр **8b** с давлением, регулируемым клапаном **8c**, прежде чем обогащенные клетки вернутся в контейнер **7a**. После того, как произошло обогащение клеток, зажим трубки **5h** закрывается, а зажим трубки **5j** открывается, чтобы позволить содержимому контейнера **7a** пройти в один из примеров, показанных на фиг. 3a или фиг. 3b. Контейнер **6a** для отходов имеет отверстия **6b** для подвешивания, чтобы поддерживать контейнер **6a** для отходов во время использования и/или транспортировки. Контейнер **7a** модуля обогащения имеет отверстия **7b** для подвешивания для поддержки контейнера **7a** во время использования и/или транспортировки. Контейнер **7a** может иметь закругленные края **7c** на

внутренних поверхностях контейнера **7a** для уменьшения потерь, которые могут возникнуть как часть перехода к примерам, проиллюстрированным на фиг. 3a или фиг. 3b. Трубка **7d** позволяет контейнеру **7a** получать содержимое контейнера **1a** через фильтрующий блок **4a** и фильтрующий блок **8a**. Трубка **7e** позволяет содержимому контейнера **7a** проходить через фильтрующий блок **8a**, задерживая и обогащая клетки, позволяя отходам и дебрису проходить через фильтр **8b** в контейнер для отходов **6a** с давлением, регулируемым клапаном **8c**, прежде чем обогащенные клетки вернутся в контейнер **7a** через открытый зажим трубки **5i**. Трубка **7f** позволяет содержимому контейнера **7a** проходить через фильтрующий блок **8a**, задерживая и обогащая клетки, позволяя отходам и мусору проходить через фильтр **8b** в контейнер для отходов **6a** с давлением, регулируемым клапаном **8c**, прежде чем обогащенные клетки вернутся в контейнер **7a**.

На ФИГ. 2с показан другой вариант осуществления модуля обогащения. Зажим трубки **5g** позволяет содержимому контейнера **1a** поступать в гибкий контейнер **7a** через фильтрующий блок **4a**. Зажим трубки **5h** позволяет содержимому контейнера **7a** проходить через фильтрующий блок **9a**, задерживая и обогащая клетки, позволяя отходам и дебрису проходить через фильтр **9b** в контейнер для отходов **6a** с давлением, регулируемым клапаном **9c**, прежде чем обогащенные клетки вернутся в контейнер **7a** через открытый зажим трубки **5i**. Зажим трубки **5i** позволяет содержимому контейнера **7a** через открытый зажим **5h** проходить через блок фильтров **9a**, удерживая и обогащая клетки, позволяя отходам и дебрису проходить через фильтр **9b** с давлением, регулируемым клапаном **9c**, прежде чем обогащенные клетки вернутся в контейнер **7a**. После того, как произошло обогащение клеток, зажим трубки **5h** закрывается, а зажим трубки **5j** открывается, чтобы позволить содержимому контейнера **7a** пройти в один из примеров, показанных на фиг. 3a или фиг. 3b. Контейнер **6a** для отходов имеет отверстия **6b** для подвешивания, чтобы поддерживать контейнер **6a** для отходов во время использования и/или транспортировки. Контейнер **7a** модуля обогащения имеет отверстия **7b** для подвешивания для поддержки контейнера **7a** во время использования и/или транспортировки. Контейнер **7a** может иметь закругленные края **7c** на внутренних поверхностях контейнера **7a** для уменьшения потерь, которые могут возникнуть как часть перехода к примерам, проиллюстрированным на фиг. 3a или фиг. 3b. Трубка **7d** позволяет контейнеру **7a** получать содержимое контейнера **1a** через фильтрующий блок **4a** и фильтрующий блок **9a**. Трубка **7e** позволяет содержимому контейнера **7a** проходить через фильтрующий блок **9a**, задерживая и обогащая клетки,

позволяя отходам и дебрису проходить через фильтр **9b** в контейнер для отходов **6a** с давлением, регулируемым клапаном **9c**, прежде чем обогащенные клетки вернутся в контейнер **7a** через открытый зажим трубки **5i**. Трубка **7f** позволяет содержимому контейнера **7a** проходить через фильтрующий блок **9a**, задерживая и обогащая клетки, позволяя отходам и дебрису проходить через фильтр **9b** в контейнер для отходов **6a** с давлением, регулируемым клапаном **9c**, прежде чем обогащенные клетки вернутся в контейнер **7a**. Фильтрующий блок **9a** способствует фильтрации содержимого контейнера **7a** для удаления отработанной среды и дебриса через фильтр **9b** в контейнер для отходов **6a** с давлением, регулируемым клапаном **9c**, прежде чем обогащенные клетки вернутся в контейнер **7a**. Фильтр **9b** можно свернуть в спираль, чтобы увеличить расстояние, на которое должны элюироваться отходы, прежде чем они достигнут контейнера для отходов **6a**, для улучшения очистки клеточной среды, но облегчить транспортировку и хранение улучшенного фильтра **9b**.

На ФИГ. 3a показан пример модуля стабилизации. Зажим трубки **5k** позволяет: перенести содержимое контейнера **1a**, как показано на ФИГ. 1, через фильтрующий блок **4a** или, как показано на ФИГ. 2a, через блок фильтров **4c**; или содержимое контейнера **7a**, как показано на ФИГ. 2b, через фильтрующий блок **8a** или, как показано на ФИГ. 2c, через блок фильтров **9a** в контейнер **10a** модуля стабилизации. Контейнер **10a** модуля стабилизации имеет отверстия **10b** для подвешивания для поддержки контейнера **10a** во время использования и/или транспортировки. Контейнер **10a** может иметь закругленные края **10c** на внутренних поверхностях контейнера **7a** для уменьшения потерь, которые могут возникнуть как часть переноса из трубки **10e** или **10f**. Трубка **10e** позволяет извлекать содержимое контейнера **10a** через соединитель **10h**. Трубка **10f** содержит гибкую мембрану, позволяющую ввести стерильную иглу через асептическую крышку **10g**, чтобы можно было извлечь содержимое контейнера **10a**.

На ФИГ. 3b показан другой вариант модуля стабилизации. Зажим трубки **5l** позволяет: перенести содержимое контейнера **1a**, как показано на ФИГ. 1, через фильтрующий блок **4a** или, как показано на ФИГ. 2a, через блок фильтров **4c**; или содержимое контейнера **7a**, как показано на ФИГ. 2b, через фильтрующий блок **8a** или, как показано на ФИГ. 2c, через блок фильтров **9a** в контейнер **11a** модуля стабилизации. Контейнер **11a** модуля стабилизации имеет отверстия **11b** для подвешивания для поддержки контейнера **10a** во время использования и/или транспортировки. Контейнер **10a** может иметь закругленные кромки **10c** на внутренних

поверхностях контейнера **7a** для уменьшения потерь, которые могут возникнуть при перемещении из трубки **11f**. Зажим трубки **5m** позволяет среде **3c** поступать в гибкий контейнер **11a** через стерильный фильтр **2c**. Зажим трубки **5n** позволяет содержимому контейнера **11a** поступать в один из контейнеров **12a** для криоконсервации в зависимости от открытого или закрытого состояния зажимов трубок **5o**, **5p**, **5q**, **5r**, **5s** и **5t**. Зажимы трубок **5o**, **5p**, **5q**, **5r**, **5s** и **5t** позволяют содержимому контейнера **11a** попасть в один из контейнеров **12a** для криоконсервации. Трубка **11d** позволяет контейнеру **11a** принимать: содержимое контейнера **1a**, как показано на ФИГ. 1, через фильтрующий блок **4a** или, как показано на фиг. 2a, через блок фильтров **4c**; или содержимое контейнера **7a**, как показано на фиг. 2b, через фильтрующий блок **8a** или, как показано на фиг. 2c, через блок фильтров **9a**. Трубка **11e** позволяет переносить среду **3c** для криоконсервации в контейнер **11a**. Трубка **11f** позволяет переносить содержимое контейнера **11a** в контейнеры для криоконсервации **12a**, где конечный дезагрегированный продукт УТИЛ в виде суспензии отдельных клеток хранится для будущего использования в процессе быстрого размножения. Контейнеры **12a** для криоконсервации имеют приспособления **12b** для обеспечения возможности асептического переноса ТП из контейнеров для криоконсервации **12a**. Контейнеры **12a** для криоконсервации имеют пространство **12c**, подходящее для объема клеточной суспензии УТИЛ, подлежащей хранению. Контейнеры **12a** для криоконсервации также имеют целевое место **12d** для приваривания трубки **11f** к контейнерам **12a** для криоконсервации.

На ФИГ. 4 показан другой пример устройства и комплекта. Штифты **13a** позволяют подвешивать среду **3a**, **3b** и **3c**. Штифты **13b** соединены с датчиками веса для подвешивания контейнера **1a** и, в зависимости от используемого варианта осуществления, могут включать один или несколько контейнеров **7a**, **10a** и/или **11a**. Датчики веса используются для определения стадий принятия решений для управления автоматизированной обработкой материалов. Термосварочный аппарат **13c** можно использовать для герметизации контейнера **1a** на целевом участке после введения резецированной ткани солидной опухоли в контейнер **1a**. Модуль дезагрегации **13d** имеет отверстие, которое может быть закрыто и заблокировано, чтобы обеспечить дезагрегацию, и может контролировать температуру в диапазоне от 0°C до 40°C с допустимым отклонением 1°C, чтобы обеспечить расщепление, где пищеварительные ферменты используются для дезагрегации ткани солидной опухоли. Модуль **13d** дезагрегации также имеет встроенный датчик для оценки уровня дезагрегации

солидной ткани путем определения изменения распределения света во времени для выявления изменений и, таким образом, определения завершения процесса дезагрегации, который происходит в течение периода времени от секунд до часов. Модуль **13d** дезагрегации может также содержать поверхности **13f** дезагрегации, которые вступают в непосредственный контакт с контейнером **1a** и упираются в заднюю часть корпуса модуля **13d** дезагрегации, который может быть закрыт и заблокирован во время дезагрегации и расщепления, когда используются ферменты. Модуль **13e** конечного состава имеет кожух, который позволяет контролировать температуру контейнеров **10a** или **11a** в зависимости от используемого варианта осуществления, что позволяет регулировать температуру от 0°C до температуры окружающей среды с допуском 1 °C. Зажимы трубок **13g** и **13j** действуют в качестве впускных и выпускных отверстий, расположенных внутри **локаторов** **13i** трубок, и облегчают транспортировку дезагрегированного опухолевого продукта между контейнерами **1a**, **10a** или **11a** в зависимости от используемого варианта осуществления. Перистальтические трубочные насосы **13h** регулируют перемещение среды **3a** или **3c** между зажимами трубок **13g** и **13j**, которые действуют в качестве впускного и выпускного отверстий. Клапан трубки **13k** помогает регулировать давление через клапаны **8c** и **9c** в модуле обогащения, как показано на фиг. 2b и 2c. Штифты **13l** позволяют подвешивать контейнер **6a** для отходов и/или контейнеры **12a** для криоконсервации в зависимости от используемого варианта осуществления. Вариант осуществления также может включать устройство **13m** для сварки трубок, необходимое для соединения контейнеров **12a** для криоконсервации с устройством, как показано на фиг. 3b. Вариант осуществления также может включать устройство **13n** для резки трубок для отсоединения контейнеров **12a** для криоконсервации от устройства, как показано на фиг. 3b. Модуль **13o** охлаждения с регулируемой скоростью способен охлаждать или поддерживать любую температуру от 8°C до по меньшей мере -80°C для облегчения процесса криоконсервации.

Способ по изобретению иллюстрируется следующим процессом. Четко указано, что, помимо основных характеристик способа, различные необязательные стадии, перечисленные в настоящем документе, могут быть независимо объединены для достижения соответствующих технических преимуществ, связанных с типом отбора проб и получаемым результатом.

Способ полуавтоматизированной асептической обработки ткани включает: автоматизированное определение стадий обработки ткани с асептической

дезагрегацией и одной или нескольких дополнительных стадий обработки ткани и связанных с ними условий по идентификатору цифровой метки на наборе для асептической обработки, необязательно в соответствии с набором, описанным в настоящем документе; помещение образца ткани в гибкий пластиковый контейнер набора для асептической обработки; и обработку образца ткани путем автоматизированного исполнения одной или нескольких стадий обработки ткани посредством связи с модулем дезагрегации и управления им; дополнительный модуль обогащения; и модуль стабилизации.

По существу, процесс может включать взятие пакета с открытым концом (первый гибкий контейнер, являющийся частью модуля дезагрегации), в который будет помещаться образец биопсии/ткани, предпочтительно резецированная опухоль, который уже соединен через одну или несколько трубок или может быть соединен через управляемое вручную асептическое соединение с

I. одним контейнером со средой для расщепления (второй гибкий контейнер, который является частью модуля дезагрегации) и со стабилизирующим раствором или без него (такой же второй гибкий контейнер также является частью модуля стабилизации),

II. одним контейнером с раствором для расщепления (второй гибкий контейнер, который является частью модуля дезагрегации) и еще одним контейнером со стабилизирующим раствором (четвертый гибкий контейнер является частью модуля стабилизации).

После внесения биопсии и запечатывания пакета с открытым концом среда для расщепления может быть добавлена через трубку или асептические соединения (трубка/отверстие по пункту 1) и обработан тканевый материал.

По завершении расщепления, когда ткань представляет собой клеточную суспензию, состоящую из единичных или небольшого количества агрегатов, клетки могут быть дополнительно отфильтрованы до стадии 4 (дополнительный модуль обогащения для фильтрации включает первый гибкий контейнер, содержащий образец и отфильтрованный в третий контейнер для приема обогащенного фильтрата).

В тех случаях, когда стабилизирующая среда не присутствует в том же гибком контейнере, контейнер со стабилизирующим раствором добавляют путем открытия присоединенной трубки или ручного асептического соединения, управляемого оператором, и указанное соединение должно быть открыто, позволяя в обоих случаях подавать стабилизирующий раствор для добавления перед продолжением процесса.

Суспензию, состоящую из единичных клеток или небольшого числа клеточных агрегатов, в исходном гибком контейнере или которая может быть дополнительно разделена на несколько контейнеров для стабилизации, хранения, после этого поддерживают в стабильном состоянии на устройстве и/или подвергают криоконсервации перед удалением для транспортировки, хранения и/или конечного использования. Модуль стабилизации также содержит первый или третий контейнер, используемый при хранении/замораживании/хранении.

В еще одном неограничивающем примере способ включает следующее:

а) Взятие образца ткани с помощью отдельной процедуры, такой как биопсия, или хирургическая операция для взятия требуемого тканевого материала (не является частью изобретения), который помещают в первоначальный гибкий пластиковый контейнер (см., например, ФИГ. 1, контейнер 1a).

б) Среду (см., например, ФИГ. 1, среда 3a) переносят в камеру для дезагрегации или, в одном примере, также вводят и собирают ферменты (см., например, ФИГ. 1, ферменты 3b) перед дезагрегацией с использованием в одном или нескольких следующих примерах по изобретению механизм, такой как датчики веса (см., например, ФИГ. 1, 13b как часть модуля 13d), который оценивает необходимое количество среды для добавления, определяемое либо непосредственным вмешательством оператора, либо весом солидной ткани.

с) Одноразовый гибкий контейнер для дезагрегации, солидную ткань, среду и в одном примере ферменты объединяют во время процесса физической дезагрегации в течение от минимум нескольких секунд до нескольких часов, при оптимальном времени от 1 до 10 минут, требуемом для разрушения солидной ткани, до тех пор, пока не будут отсутствовать визуальные изменения (см. фиг. 5 и таблицу 1). Устройство дезагрегации предназначено для сжатия тканей с использованием переменной скорости и времени в зависимости от времени, необходимого для дезагрегации, и обратной связи через датчики в модуле дезагрегации (см. фиг. 1, 13d).

д) В одном варианте осуществления, в котором присутствуют ферменты, потребуются периоды инкубации при оптимальной температуре 30-37°C, но может быть и от 0°C до 40°C в течение по меньшей мере от 1 минуты до нескольких часов, но более предпочтительно от 15 до 45 минут.

е) Стадию с) и в варианте осуществления, в котором присутствуют ферменты, стадию d) можно повторять до тех пор, пока ткань не перестанет изменяться или, например, не будет дезагрегирована в жидкую клеточную суспензию, в

зависимости от того, что наступит первым, под контролем датчика в модуле дезагрегации (см. фиг. 1, 13d).

f) В одном варианте осуществления удаляются не полностью дезагрегированные ткани, связанный материал и примеси, что позволяет обогащать клеточную суспензию путем пропускания дезагрегированной ткани и среды с использованием одного или нескольких из следующих вариантов осуществления:

i. Прямой проход через один или несколько механических фильтров с отверстиями размером от по меньшей мере $>0,1$ мкм до 1000 мкм, но наиболее предпочтительно 50-250 мкм и более предпочтительно 100-200 мкм (показано на ФИГ. 2a).

ii. Разделение на основе плотности с использованием центрифугирования и/или седиментации с использованием раствора с заданным градиентом плотности, соответствующим клеткам, или без него (например, Ficoll-paque GE Healthcare).

iii. Гидродинамическая фильтрация, при которой поток жидкости и материалы, препятствующие потоку, улучшают разрешение и фракционирование клеток и примесей в зависимости от размера и формы.

iv. Проточное фракционирование в силовом поле, при котором приложенное поле (например, потоковое, электрическое, гравитационное, центробежное) действует в направлении, перпендикулярном или обратном направлению выбранного потока (например, тангенциальная поточная фильтрация, поточная фильтрация с полым волокном, асимметричная поточная фильтрация, центробежная поточная фильтрация). В этом случае: клетки или примеси, которые больше всего реагируют на силу, оттесняются к стенке, где поток наименьший и, следовательно, длительное время удерживания; в то время как клетки или примеси, которые меньше всего реагируют на силу, остаются ламинарными по отношению к потоку и быстро элюируются (тангенциальная поточная фильтрация, показанная на ФИГ. 2b и c).

v. Акустофорез, при котором одна или несколько акустических частот, настроенных или гармонизированных с популяциями клеток или примесей, используются для перемещения требуемых клеток или примесей по тангенциальному пути к входному потоку.

g) В одном варианте осуществления дезагрегированный обогащенный тканевый продукт ресуспендируют в свежей среде (ФИГ. 2a с использованием среды 3a), такой как:

i. среда для обогащения клеток, чтобы пройти независимую процедуру целевого обогащения, как описано ранее,

ii. непосредственно культура клеток или среда для хранения в холодильнике (например, HypoThermosol® от BioLife Solutions,

h) в варианте осуществления, используемом в g), ресуспендированный продукт, полученный из дезагрегированной солидной ткани, переносят в один из контейнеров для конечного продукта (показан на ФИГ. 3a) для хранения в течение от нескольких часов до нескольких дней перед использованием для конечного применения.

i) в ином случае после стадии f) вариант осуществления (показанный на ФИГ. 3b) будет применяться, когда продукт, полученный из дезагрегированной солидной ткани, подвергается ресуспендированию в криопротекторе (ФИГ. 3b, среда 3c), растворе для замораживания для хранения продукта, полученного из дезагрегированной солидной ткани, на срок от нескольких дней до нескольких лет, например раствор CryoStor® Freezing от BioLife Solution.

j) На этой стадии продукт, полученный из дезагрегированной солидной ткани, повторно суспендируют в растворе для замораживания (ФИГ. 4, модуль 13e) и переносят в один или несколько гибких контейнеров для криоконсервации (показаны на ФИГ. 3a, контейнер 12a), и в одном варианте осуществления устройства предусматривается процесс замораживания с регулируемой скоростью (ФИГ. 4, модуль 13o).

k) После этого пакеты могут быть отделены от устройства и набора для асептической обработки для независимого хранения или распределения.

В дополнительных вариантах осуществления одноразовый набор по изобретению можно использовать с автоматизированным устройством для полуавтоматизированной асептической обработки образцов ткани. На ФИГ. 6 и 7 показаны одноразовые наборы по изобретению.

На ФИГ. 6 изображен полуавтоматизированный способ асептической обработки ткани с использованием нескольких гибких контейнеров для различных исходных растворов, которые являются частью модулей процесса, используемого для дезагрегации и стабилизации.

Стадия 1 процесса - Пользователь может войти в систему и отсканировать метку на асептическом наборе с помощью устройства, чтобы передать информацию о стадиях автоматизированной обработки, которые будут использованы. Процессор устройства

распознает метку и получает информацию, необходимую для выполнения конкретных инструкций по обработке, относящихся к этому конкретному набору.

Стадия 2 процесса – Гибкий пакет (часть модуля дезагрегации), содержащий среду для расщепления, и гибкий пакет (часть модуля стабилизации), содержащий крио/стабилизирующий раствор, подвешивают или прикрепляют к устройству.

Стадия 3 процесса – Взятый методом биопсии образец, или образец ткани для обработки помещают в гибкий контейнер (часть обоих модулей) асептического набора через открытый конец.

Стадия 4 процесса - Затем гибкий контейнер, содержащий образец, запечатывают с использованием термосварки для закрытия открытого конца (используемого для внесения образца во время начальной обработки).

Стадия 5 процесса - Затем пользователь может взаимодействовать с пользовательским интерфейсом процессора, чтобы подтвердить наличие образца ткани и ввести любую дополнительную информацию, относящуюся к тканевому материалу, по необходимости.

Стадия 6 процесса - Гибкие контейнеры со средой для расщепления и крио/стабилизирующим раствором соединяют с гибким контейнером, содержащим образец, после чего его помещают в устройство для автоматизированной обработки.

Стадия 7 процесса - Устройство исполняет циклы в соответствии с информацией о наборе, выполняя дезагрегацию образца и стабилизацию/криоконсервацию полученных клеток.

Стадия 8 процесса - После стабилизации/замораживания отсоединяют и отбрасывают использованную среду и контейнеры для криоконсервации/стабилизации из набора. Гибкий контейнер, содержащий ткани, переработанные в одно- или многоклеточный раствор, отсоединяют перед переносом в контейнер для хранения или транспортировки до конечного применения.

В другом варианте осуществления на фиг. 7 изображены гибкие контейнеры, содержащие среду, используемую в процессе, которую может совместно использоваться модулями набора для асептической обработки и способа.

Стадия 1 процесса - Пользователь может войти в систему и отсканировать метку на асептическом наборе с помощью устройства, чтобы передать стадии автоматизированной обработки, которые будут использованы.

Стадия 2 процесса - Гибкий пакет (часть модуля дезагрегации/стабилизации), содержащий среду и крио/стабилизирующий раствор, подвешивают или иным образом прикрепляют к устройству.

Стадия 3 процесса – Образец, полученный методом биопсии, или образец ткани для обработки помещают в дополнительный гибкий контейнер (часть обоих модулей) асептического набора через открытый конец.

Стадия 4 процесса - Затем гибкий контейнер, содержащий образец, запечатывают с использованием термосварки для закрытия открытого конца.

Стадия 5 процесса - Затем пользователь взаимодействует с пользовательским интерфейсом процессора, чтобы подтвердить наличие образца ткани и ввести любую информацию, относящуюся к тканевому материалу, при необходимости.

Стадия 6 процесса - Гибкий контейнер со средой для расщепления и крио/стабилизирующим раствором соединяют с гибким контейнером, содержащим образец, после чего его помещают в устройство для автоматизированной обработки.

Стадия 7 процесса - Устройство выполняет циклы, обеспечивающие дезагрегацию образца и стабилизацию полученных клеток, необязательно посредством криоконсервации.

Стадия 8 процесса - Когда замораживание/стабилизация завершена, пользователь отсоединяет и отбрасывает использованные гибкие контейнеры из набора. Гибкий контейнер, содержащий ткань, переработанную в одно- или многоклеточный раствор, отсоединяют перед переносом в контейнер для хранения или транспортировки перед ее окончательным применением.

В качестве примера, в другом варианте осуществления способа по изобретению, где процесс дезагрегации дополнен ферментативным расщеплением, в состав среды для ферментативного расщепления должны быть добавлены ферменты, которые способствуют расщеплению белка, вызывая разрушение межклеточных границ, как описано выше.

Различные жидкие составы, известные в области культивирования клеток или обработки клеток, могут быть использованы в качестве жидких составов, используемых для дезагрегации клеток и ферментативного расщепления солидных тканей, включая, но без ограничения, одну или несколько следующих сред: растворы для консервации органов, растворы для селективного лизиса, PBS, DM EM, HBSS, DPBS, PM I, среда Искова, XVIVO™, AIM-V™, раствор Рингера с лактатом, ацетат Рингера, физиологический раствор, раствор PLASMALYTE™, кристаллоидные

растворы и жидкости для внутривенного введения, коллоидные растворы и жидкости для внутривенного введения, пятипроцентная декстроза в воде (D5W), раствор Хартмана DM EM, HBSS, DPBS, RPMI, AIM-V™, среда Iscove, XVIVO™, каждая из которых может быть необязательно дополнена дополнительными поддерживающими клетки факторами, например, эмбриональной телячьей сывороткой, человеческой сывороткой или заменителями сыворотки, или другими питательными веществами или цитокинами, чтобы способствовать восстановлению и выживанию клеток или специфическому истощению клеток. Среда может представлять собой стандартную клеточную среду, такую как упомянутая выше среда, или специальную среду, например, для первичной культуры клеток человека (например, для клеток эндотелия, гепатоцитов или кератиноцитов) или стволовых клеток (например, для созревания дендритных клеток, гемопоэтической экспансии, кератиноцитов, мезенхимальных стволовых клеток или Т-клеток). Среда может содержать добавки или реагенты, хорошо известные в данной области, например, альбумины и транспортные белки, аминокислоты и витамины, ионы металлов, антибиотики, факторы прикрепления, факторы открепления, поверхностно-активные вещества, факторы роста и цитокины, гормоны или солибилизирующие агенты. Различные среды являются коммерчески доступными, например, от фирмы ThermoFisher, Lonza или Sigma-Aldrich, или аналогичных производителей и поставщиков сред.

Жидкий состав, необходимый для ферментативного расщепления, должен иметь достаточное количество ионов кальция, присутствующих при концентрации по меньшей мере от 0,1 мМ до 50 мМ с оптимальным диапазоном 2-7 мМ, в идеальном случае составляет 5 мМ.

Солидная ткань, подлежащая расщеплению, может быть промыта после дезагрегации жидким составом, содержащим хелатирующие агенты EGTA и EDTA, чтобы удалить факторы адгезии и ингибирующие белки перед промывкой и удалением EGTA и EDTA до ферментативного расщепления.

Жидкий состав, необходимый для ферментативного расщепления, является более оптимальным с минимальным количеством хелатирующих агентов EGTA и EDTA, которые могут сильно ингибировать активность фермента путем удаления ионов кальция, необходимых для стабильности и активности фермента. Кроме того, другими известными ингибирующими веществами являются б-меркаптоэтанол, цистеин и 8-гидроксихинолин-5-сульфонат.

Как описано в предпочтительных вариантах осуществления, конечный контейнер для клеток для криоконсервации представляет собой гибкий контейнер, изготовленный из упругого деформируемого материала. В этом варианте осуществления устройства конечный контейнер либо переносится непосредственно в морозильную камеру при температуре от -20°C до -190°C или выше, в оптимальном случае помещают в морозильный аппарат с регулируемой скоростью, связанный с устройством или поставляемый отдельно (производимый, например, Planer Products или Asymptote Ltd), в котором температура морозильной камеры и гибкого контейнера(ов) для хранения, используемого для хранения контейнера с обогащенной дезагрегированной солидной тканью, регулируется либо путем: введения холодного газа (обычно азота, например, продуктов Planer); или путем отвода тепла от контролируемой охлаждаемой поверхности(ей). Оба способа позволяют точно контролировать с погрешностью менее 1°C или более предпочтительно $0,1^{\circ}\text{C}$ процесс замораживания при требуемой скорости для замораживания конкретной клетки (клеток) на основе раствора для замораживания и желаемой жизнеспособности продукта. Этот процесс криоконсервации должен учитывать температуру образования центров кристаллизации льда, которая в идеальном случае должна быть как можно ближе к температуре плавления замораживающего раствора. После роста кристаллов в водном растворе воду удаляют из системы в виде льда, и концентрация остаточного незамороженного раствора увеличивается. По мере снижения температуры образуется больше льда, уменьшая остаточную незамороженную фракцию, концентрация которой еще больше увеличивается. В водных растворах существует большой диапазон температур, в котором лед сосуществует с концентрированным водным раствором. В конце концов, за счет снижения температуры раствор достигает состояния стеклования, после чего замороженный раствор и клетки переходят из вязкого раствора в твердое состояние. Ниже этой температуры клетки не могут подвергаться дальнейшим биологическим изменениям и, следовательно, стабилизируются на годы или десятилетия, пока не потребуется.

Дезагрегированные клеточные продукты, полученные с помощью способа по настоящему изобретению, могут быть культивированы и/или проанализированы (охарактеризованы) в соответствии со всеми способами, известными специалисту в данной области.

ТП, получаемые с помощью раскрытых в настоящем документе способов, можно использовать для последующих стадий, таких как исследования, диагностика,

банки тканей, биобанки, фармакологические или клинические применения, известные специалисту в данной области. Затем ТП можно культивировать с использованием среды, оптимизированной для этого применения, например, среды T cell Mixed Media (Cellular Therapeutics), обычно содержащей, но без ограничения, факторы роста, такие как ИЛ-2, ИЛ-7, ИЛ-15, ИЛ-21, или стимулирующие условия, такие как планшеты или полистирольные шарики, покрытые антителами. В настоящем изобретении изолированные клетки высевали в контейнеры для культивирования и поддерживали с использованием процедур, стандартных для специалистов в данной области, таких как влажная атмосфера (1-20%, обычно 5% CO₂, 80-99%, обычно 95% воздуха) при температуре 1-40°C, обычно 37°C, в течение нескольких недель, и могут быть внесены добавки с 10% FBS и 3000 МЕ/мл ИЛ-2.

Обогащенные ТП можно использовать до и/или после культивирования клеток в качестве фармацевтической композиции в терапии, например, клеточной терапии или предупреждении заболеваний. Фармацевтическую композицию можно применять для лечения и/или предупреждения заболеваний у млекопитающих, особенно у человека, возможно включающего введение млекопитающему фармацевтически эффективного количества фармацевтической композиции.

Такие культуры ТП, кроме того, что их составляют в качестве лекарственного препарата для лечения различных видов рака, можно применять для изучения, например, клеточной функции, уничтожения опухолевых клеток, клеточной сигнализации, биомаркеров, клеточных путей, нуклеиновых кислот и других факторов, связанных с клеткой или тканью, которые можно использовать для идентификации статуса донора, ткани, клетки или нуклеиновой кислоты.

Заболевание может представлять собой любое заболевание, которое можно лечить и/или предупредить за счет присутствия клеток, происходящих из солидной ткани, и/или за счет увеличения концентрации соответствующих клеток в соответствующем месте, т.е. в опухолях или очагах заболевания. Заболевание, которое лечат и/или превентивно лечат, может представлять собой любое нарушение, например, рак или дегенеративное заболевание. Лечение может представлять собой трансплантацию обогащенных, сконструированных или размноженных клеток, или любой их комбинации, и либо введение в соответствующую часть тела, либо системное введение.

Фармацевтические композиции по настоящему изобретению можно вводить способом, подходящим для заболевания, подлежащее лечению (или предупреждению).

Количество и частота введения будут определяться такими факторами, как состояние пациента, а также тип и тяжесть заболевания пациента, хотя соответствующие дозы могут быть определены в ходе клинических испытаний.

Как описано в настоящем документе, изобретение обеспечивает набор, который позволяет принимать, обрабатывать, хранить и/или изолировать материал, такой как ткань, в частности, ткань млекопитающего. Кроме того, изобретение обеспечивает компоненты набора, такие как гибкие контейнеры, например, пакеты, фильтры, клапаны, кронштейны, зажимы, коннекторы и/или каналы, такие как трубки. В частности, пакеты могут быть соединены с одной или несколькими трубками или секциями трубок, приспособленными для обеспечения потока тканевого материала между различными компонентами набора для криоконсервации.

Переработка ткани в клетки с использованием набора для криоконсервации и/или пакета для сбора может включать автоматизированные и/или полуавтоматизированные устройства и способы.

Более того, путем использования пакетов, наборов, устройств и процессов, описанных в настоящем документе, специалист в данной области может легко идентифицировать дополнительные варианты осуществления настоящего изобретения. Специалисты в данной области легко поймут известные варианты.

Заявка на патент на промышленный образец с серийным номером 29/740293 обеспечивает пакет для сбора тканей, пригодный для сбора тканей. Верхняя часть пакета для сбора тканей по изобретению является открытой для приема ткани, например, ткани, полученной методом биопсии, такой как раковая ткань животного (например, домашнего животного, такого как собака или кошка) или раковая ткань человека. Пакет для сбора ткани должен быть запечатан с собранной внутри него тканью, и для ткани, запечатанной в нем таким образом, подлежащей обработке внутри него, например, обработка может включать встряхивание и/или сжатие, например, осторожное встряхивание и/или сжатие, и/или ферментативное расщепление ткани. Преимущественно обработку ткани и извлечение из нее желаемого материала, такого как инфильтрирующие опухоль лимфоциты (ТЛ), можно осуществлять в закрытой системе. Преимущественные или предпочтительные варианты осуществления могут включать знаки, обозначающие пациента, у которого была взята ткань, и/или знаки, указывающие, где пакет для сбора может быть зажат или закреплен на месте в приборе для применения перемешивания, и/или знаки, указывающие, где пакет для сбора может быть запечатан, например, путем термосварки (которая может являться частью

инструмента для обработки). Преимущественно перед применением обработки пакет для сбора зажимают или прикрепляют к инструменту для обработки и/или запечатывают, например, термосваривают. На некоторых иллюстрациях трубки могут быть показаны пунктирными линиями или пунктиром, чтобы показать, что трубки не обязательно считаются частью конструкции по изобретению; но в некоторых вариантах осуществления могут считаться частью конструкции по изобретению. Пунктирные линии или штриховые линии следует интерпретировать как то, что трубка может присутствовать или отсутствовать, и может быть заявлена как одна из них, так и обе, т.е. на всех чертежах трубка может составлять часть конструкции по изобретению (а также может не обязательно быть частью конструкции по изобретению). Кроме того, несмотря на то, что на некоторых иллюстрациях не показаны знаки, знаки, которые могут указывать на пациента, у которого был взят образец, знаки, которые могут указывать на пациента, у которого был взят образец и где пакет для сбора ткани может быть зажат или прикреплен к прибору, и знаки, которые могут указывать на пациента, у которого был получен образец и где пакет для сбора ткани может быть зажат или прикреплен к прибору, и где пакет для сбора ткани может быть запечатан, например, термосварен, следует понимать, что дизайн по изобретению может включать его варианты, например, дизайн по изобретению может включать знаки, которые могут указывать на пациента, от которого был получен образец и где пакет для сбора тканей может быть запечатан, без также знаков, показывающих, где пакет для сбора тканей может быть зажат или прикреплен к прибору; и конструкция по изобретению может включать знаки, которые могут указывать, где пакет для сбора тканей может быть термосварен, и/или знаки, показывающие, где пакет для сбора тканей может быть зажат или прикреплен к прибору, но без знаков, указывающих на пациента, у которого был взят образец (включая то, что знаки, указывающие на пациента, могут быть отпечатаны на пакете для сбора тканей по мере его использования, тогда как знаки, касающиеся зажима, прикрепления или термосваривания, могут уже присутствовать на пакете для сбора тканей до его использования). Пакет для сбора тканей, включая любые связанные с ним трубки, может быть, как правило, светлыми, прозрачными или полупрозрачным, или иметь любой желаемый цвет. Пакет для сбора тканей, включая любые связанные с ним трубки, как правило, может быть изготовлен с помощью способов, аналогичных изготовлению: закрытых или запечатанных пакетов, пакетов для сбора крови, пакетов для культур тканей, пакетов для биологической обработки или криоконсервации и связанных с ними трубок. Связанные трубки в изобретении

могут быть изготовлены из любого желаемого материала, из поливинилхлорида (PVC) или материала, включающего PVC, в качестве желаемого материала, который лучше подходит для сварки и/или запечатывания. Часть пакета для сбора ткани по настоящему изобретению, предназначенная для приема ткани, может быть изготовлена из любого желаемого материала, из этиленвинилацетата (EVA) или материала, включающего EVA в качестве желаемого материала, поскольку он является предпочтительным для термосварки.

На ФИГ. 11А показан вариант осуществления набора 2 для обработки ткани, например, дезагрегации, обогащения и/или стабилизации ткани. Подлежащая обработке ткань может включать солидную эукариотическую, в частности, ткань млекопитающего, такую как ткань, полученную из образца и/или методом биопсии. Набор 2 включает компоненты, такие как пакеты 4, 6, такие как пакет для сбора 4 и пакет для криоконсервации 6. Наборы, показанные на фиг. 11А-Д, можно использовать в автоматизированном или полуавтоматизированном устройстве для обработки.

В некоторых вариантах осуществления компоненты набора могут включать индикаторы, такие как коды, буквы, слова, имена, буквенно-цифровые коды, числа, изображения, штрих-коды, коды быстрого ответа (QR), трекеры, такие как трекер-метки Smart Tracker Tags или Bluetooth-трекеры, метки, такие как радиочастотная метка, и/или другая цифровая распознаваемая идентификационная метка, чтобы ее можно было сканировать и распознавать во время автоматизированной и/или полуавтоматизированной обработки, например, в автоматизированном устройстве в вариантах осуществления настоящего изобретения. Например, метка может предоставлять информацию об условиях и/или стадиях, требуемых для автоматизированной обработки. Например, сканирование компонента набора, такого как пакет, может позволить автоматизированной системе, используемой с набором, обрабатывать ткани без дальнейшего вмешательства и/или загрязнения. В частности, образец ткани, помещенный в пакет для сбора для обработки в дезагрегационном элементе устройства. Пакет для сбора может быть запечатан до начала обработки. В некоторых вариантах осуществления пакет для сбора может быть запечатан вручную и/или автоматически с использованием такой энергии, как тепло, радиочастотная энергия, высокочастотная (ВЧ) энергия, диэлектрическая энергия и/или любым другим способом, известным в данной области, до начала обработки.

В некоторых вариантах осуществления аппарат для термосварки (например, Van der Staehl MS-350, Uline H-190 Impulse Sealer, или аналогичные аппараты для

термосварки, известные в данной области) с нагревательным стержнем можно использовать для создания шва на пакете.

В конкретном варианте осуществления при использовании аппарат для термосварки предпочтительно формировать шов при температуре ниже, чем примерно 100°C и при давлении в диапазоне от примерно 0,8 бар до примерно 2,8 бар. Эти повышенные температура и давление могут применяться в течение примерно восьми секунд, после чего температура может быть снижена, но в некоторых вариантах осуществления давление продолжают прикладывать в течение примерно 2-3 секунд. Значения температуры, давления и времени будут варьироваться в зависимости от состава материала, образующего пакет, и, в частности, материала, формирующего шов. Например, для другого материала может потребоваться, чтобы аппарат для термосварки достигал температуры выше, чем примерно 210°F (98,9°C) в течение как минимум примерно 3 секунд, после чего нагревательному стержню можно дать остыть в течение 5 секунд до его снятия.

Расположение материала, подлежащего запечатыванию, может иметь решающее значение для прочности сформированного шва. Например, неполные швы, складки, каналы и/или зазоры в подлежащем запечатыванию материале могут снизить прочность шва.

Сварные швы могут быть испытаны на прочность с использованием испытания на расслаивание сварного шва (например, ASTM F88/F88M) и/или испытания на разрыв (например, ASTM F1140/F1140M или ASTM F2051/F2054M).

В некоторых вариантах осуществления пакет или гибкий контейнер могут выдерживать силу в 100 ньютонов во время использования, если он должным образом запечатан и дополнительно закреплен зажимом при размещении внутри устройства для обработки и/или переработки. Вариант осуществления пакета или гибкого контейнера может быть сконструирован таким образом, чтобы выдерживать силу в 75 ньютонов во время использования, если он должным образом запечатан и дополнительно закреплен зажимом при размещении внутри устройства для обработки и/или переработки.

Как показано на ФИГ. 11А, набор 2 включает элемент дезагрегации 4, в котором может быть обработан пакет для сбора 5, элемент обогащения 8, в котором может быть расположен фильтр 9, и элемент стабилизации 6, где пакет для криоконсервации 7 используется для сохранения желаемого материала. В компоненте набора 2, таком как пакет для сбора 5, происходит обработка ткани. Например, пакет для сбора 5 можно использовать для дезагрегации солидной ткани, полученной из эукариотических

клеток. Ткань может быть обработана таким образом, что большая часть ткани, полученной после обработки, может представлять собой отдельные клетки и/или агрегаты с небольшим числом клеток. Кроме того, обработка может происходить в наборе и/или, в частности, в пакете для сбора.

Обогащение обрабатываемой ткани может происходить в элементе для обогащения 8 в фильтре 9. Фильтр 9 может быть выбран таким образом, чтобы отфильтрованная композиция (т.е. желаемый материал), поступающая в трубку 11, могла содержать компоненты, имеющие заданный размер. Фильтр 9 может быть выбран таким образом, чтобы требуемая композиция материала, поступающего в трубку 11, могла содержать такие компоненты, как инфильтрирующие опухоль лимфоциты (TIL), имеющие средний размер менее чем примерно 200 мкм. В частности, в одном из вариантов осуществления желаемый материал может включать инфильтрирующие опухоль лимфоциты (TIL), имеющие средний размер менее чем примерно 170 мкм.

В некоторых вариантах осуществления желаемый материал может включать инфильтрирующие опухоль лимфоциты (TIL), имеющие размер в диапазоне от примерно 15 мкм до примерно 500 мкм. Например, в одном варианте осуществления фильтр 9 может быть выполнен таким образом, что композиция ткани, поступающая в трубку 11, содержит компоненты, имеющие средний размер менее чем примерно 200 мкм. В частности, желаемый материал, выходящий из фильтра и поступающий в трубку 11 после фильтрации, может содержать компоненты, имеющие средний размер менее чем примерно 170 мкм.

В некоторых вариантах осуществления фильтр 9 выполнен таким образом, что отфильтрованная композиция, поступающая в трубку 11, содержит компоненты, имеющие размер в диапазоне от примерно 50 мкм до примерно 300 мкм. Например, в одном варианте осуществления фильтр 9 может быть выполнен таким образом, что композиция ткани, поступающая в трубку 11, содержит компоненты, имеющие средний размер в диапазоне от примерно 150 мкм до примерно 200 мкм.

Как показано на ФИГ. 11А, стабилизирующий элемент 6 системы для обработки ткани представляет собой место, где пакет 7 для криоконсервации может быть использован для стабилизации композиции ткани для хранения и/или транспортировки.

На ФИГ. 11В показан комплект 2 с клапанами 12, 13. Клапаны могут представлять собой безигольные клапаны. Клапаны 12, 13 можно использовать для подачи ферментных сред, таких как среда для расщепления опухоли, среда для

криопротекторов и/или среда для криоконсервации. В частности, клапан 12 можно использовать для подачи ферментной среды в трубку 10. Ферментная среда может поступать в пакет для сбора 4, чтобы способствовать обработке ткани, помещенной в пакет 5.

Клапан 13 можно использовать для подачи криопротектора, такого как раствор DMSO, в трубку 11, чтобы раствор DMSO мог перемещаться в пакет для криоконсервации 7. В некоторых вариантах осуществления криопротектор, такой как раствор DMSO, может смешиваться с отфильтрованным материалом, поступающим в трубку 11, таким образом, чтобы объединенная композиция раствора DMSO и отфильтрованного материала поступала в пакет для криоконсервации 7. Отфильтрованный материал, поступающий в трубку 11, может включать такие компоненты, как инфильтрирующие опухоль лимфоциты (TIL), имеющие заданный средний размер. Например, в некоторых вариантах осуществления средний размер компонентов в отфильтрованной композиции может составлять менее чем примерно 200 мкм.

В некоторых вариантах осуществления, как показано на ФИГ. 11C, комплект 2 включает зажимы 14 вокруг фильтра 9, чтобы гарантировать, что материалы, подаваемые через клапаны 12, 13, препятствуют и/или предотвращают попадание в фильтр 9. Клапан 13 можно использовать для подачи криопротектора в трубку 11, чтобы криопротектор мог смешиваться с отфильтрованным материалом, поступающим в трубку 11 из фильтра 9. Например, зажим 14 может быть расположен таким образом, чтобы препятствовать и/или предотвращать движение потока криопротектора в направлении фильтра 9. В некоторых вариантах осуществления после того, как отфильтрованный раствор начинает течь из фильтра 9, зажим 14 будет разблокирован, так что комбинированная композиция криопротектора и отфильтрованного материала поступает в пакет для криоконсервации 7 на стабилизирующем элементе 6. Отфильтрованный материал, поступающий в трубку 11, может включать компоненты, такие как инфильтрирующие опухоль лимфоциты (TIL), имеющие заданный средний размер. Например, в некоторых вариантах осуществления средний размер компонентов в отфильтрованной композиции может составлять менее чем примерно 200 мкм.

Вариант осуществления набора 2 может включать отверстия 16 на пакете для криоконсервации 7, как показано на ФИГ. 11D. Отверстия могут быть использованы для добавления и/или удаления материалов из пакета для криоконсервации 7. Например, из пакета для криоконсервации могут быть извлечены тестовые образцы.

На ФИГ. 12А показан вид в перспективе варианта осуществления пакета 22 для использования в наборе. Пакет 22 может включать коннектор 24, открытую секцию 26, запечатанную секцию 21 и позиционеры 23. Коннектор 24 может быть использован для соединения пакета 22 с трубкой 25. Позиционеры 23 могут представлять собой отверстия в пакете 22.

Пакеты, такие как пакеты для сбора и/или пакеты для криоконсервации, и любые связанные с ними трубки могут быть, как правило, светлыми, прозрачными, полупрозрачными, любого желаемого цвета или их комбинацией. Пакеты, например, пакеты для сбора и/или пакеты для криоконсервации, и/или трубки, как правило, могут быть изготовлены с помощью способов, аналогичных изготовлению закрытых и/или запечатанных пакетов для крови и/или криоконсервации, и соответствующих трубок.

Пакеты для использования в изобретении, описанном в настоящем документе, включают пакет для сбора, и мешок для криоконсервации может включать по меньшей мере часть, изготовленную из заранее определенного материала, такого как термопласт, полиолефиновый полимер, этиленвинилацетат (EVA), смеси, такие как сополимеры, например, смесь винилацетата и полиолефинового полимера (например, пленка OriGen Biomedical EVO), материал, который включает EVA, и/или соэкструдированные слои герметизируемых пластиков.

Материалы для использования в пакете могут быть выбраны по определенному свойству и/или набору свойств, например, по способности к запечатыванию, такой как способность к запечатыванию путем тепловой сварки или использования радиочастотной энергии, по газопроницаемости, по гибкости, например, гибкости при низкой температуре (например, при -150°C или -195°C), по эластичности, например, эластичности при низкой температуре, по химической стойкости, по оптической прозрачности, по биосовместимости, такой как цитотоксичность, по гемолитической активности, по устойчивости к выщелачиванию, по низкому содержанию твердых частиц, по высокой скорости пропускания определенных газов (например, кислорода и/или углекислого газа) и/или по соответствию нормативным требованиям. Например, материалы, используемые в пакете, могут быть выбраны с учетом прочности на растяжение выше, чем примерно 2500 фунтов на квадратный дюйм (172 бара) при испытании в соответствии с методом испытаний на прочность на растяжение, изложенным в ASTM D-638. В частности, в варианте осуществления гибкого контейнера, такого как пакет, используются материалы, имеющие предел прочности при растяжении более чем примерно 2800 фунтов на квадратный дюйм (193 бара) при

испытании в соответствии с методом испытаний на предел прочности, изложенным в ASTM D-638.

В некоторых вариантах осуществления материалы могут быть выбраны по конкретным свойствам для использования в сконструированном материале для формирования по меньшей мере одного слоя пакета. Слои могут быть сконструированы таким образом, что сконструированный внутренний слой пакета является относительно биосовместимым, то есть материал на внутренней поверхности пакета является стабильным и не просачивается в содержимое пакета.

Например, представляющее интерес свойство, которое может быть использовано для выбора материала для компонента набора, такого как пакет для сбора, пакет для криоконсервации и/или связанные с ними трубки, может относиться к запечатыванию, например, термосвариванию.

Сварные швы могут быть испытаны на прочность с использованием испытания на расслаивание сварного шва (например, ASTM F88/F88M) и/или испытания на разрыв (например, ASTM F1140/F1140M или ASTM F2051/F2054M).

В некоторых вариантах осуществления пакет или гибкий контейнер может выдерживать силу в 100 ньютонов во время использования, если он должным образом запечатан и дополнительно закреплен зажимом при размещении внутри устройства для обработки и/или переработки. Вариант осуществления пакета или гибкого контейнера может быть сконструирован таким образом, чтобы выдерживать силу в 75 ньютонов во время использования, если он должным образом запечатан и дополнительно закреплен зажимом при размещении внутри устройства для обработки и/или переработки.

Размеры пакетов, в частности, пакетов для сбора и/или пакетов для консервации, могут зависеть от устройства, используемого для проведения лечения и/или обработки. Размер мешка следует корректировать в зависимости от конфигурации и/или размера устройств, используемых для проведения лечения. Особое внимание следует уделить размещению и/или размеру любого компонента, выходящего за пределы пакета, например, отверстие, коннектор и т.п. Такие компоненты, как отверстия, могут мешать работе устройства, используемого для проведения лечения и/или обработки. Кроме того, следует позаботиться о том, чтобы толщина пакетов соответствовала требованиям машины, в частности, в отношении запечатываемого материала, такого как изготовленный сварной шов.

Трубки по изобретению могут быть изготовлены из любого желаемого материала, включая, но без ограничения, поливинилхлорид (PVC). Например, PVC

может являться желательным материалом, поскольку PVC лучше всего подходит для сварки и/или запечатывания.

В некоторых вариантах осуществления, как показано на ФИГ. 12А-12Е, 13А-13Е, 14, 20А-20Е, 21А-21Е, 22А-22D, 27А, 28, 33 и 34, по меньшей мере один конец пакета для сбора может быть открыт для приема ткани. В частности, в одном варианте осуществления образец ткани, например, полученный путем биопсии, может быть помещен в пакет через открытый конец, например, верхний конец. В некоторых случаях образец биопсии может представлять собой раковую ткань животного (например, домашнего животного, такого как собака или кошка) или человека.

Как показано на ФИГ. 12А, пакет 22 можно использовать в качестве пакета для сбора тканей. Например, после помещения ткани в пакет, пакет может быть запечатан, а затем обработан. Обработка может включать встряхивание, например, осторожное встряхивание, извлечение и/или ферментативное расщепление ткани в пакете. Обработка тканей и извлечение из них желаемого материала, такого как инфильтрирующие опухоль лимфоциты (ТИЛ), могут осуществляться в закрытой системе. Преимущественные или предпочтительные варианты осуществления могут включать индикаторы для идентификации пациента, у которого была взята ткань, и/или метки, показывающие, был ли пакет для сбора закрыт зажимом, запечатан, подвергнут воздействию устройства и/или закреплен на месте в приборе.

В некоторых вариантах осуществления пакет 22 может быть изготовлен из запечатываемого материала. Например, пакет 22 может быть изготовлен из материалов, включая, но без ограничения, полимеры, такие как синтетические полимеры, включая алифатические или полуароматические полиамиды (например, нейлон), этиленвинилацетат (EVA) и их смеси, термопластичные полиуретаны (TPU), полиэтилены (PE), смеси винилацетата и полиолефиновых полимеров и/или комбинации полимеров. Части пакета могут быть запечатаны и/или сварены с помощью энергии, такой как тепло, радиочастотная энергия, высокочастотная (HF) энергия, диэлектрическая энергия, и/или любым другим способом, известным в данной области.

Мешок для сбора можно использовать в качестве пакета для обработки и/или дезагрегации. Пакеты для сбора могут иметь ширину в диапазоне от примерно 4 см до примерно 12 см и ширину в диапазоне от примерно 10 см до примерно 30 см.

Например, мешок для сбора для использования в обработке может иметь ширину примерно 7,8 см и длину около 20 см. В частности, мешок может быть

термосвариваемым, например, с использованием полимера EVA или его смесей, смеси винилацетата и полиолефинового полимера и/или одного или нескольких полиамидов (нейлона).

Как показано на ФИГ. 12А, пакет 22 можно использовать в качестве пакета для сбора ткани для запечатывания в нем ткани для обработки согласно изобретению.

На ФИГ. 12В показан вид в перспективе варианта осуществления пакета 22 для использования в качестве пакета для сбора ткани. Ткань может быть запечатана в пакете и затем обработана. Пакет 22, как показано на ФИГ. 12В, может быть помечен индикаторами 27, 28, такими как идентификатор пациента, который может идентифицировать пациента, у которого был взят или получен образец ткани или биопсия.

Индикаторы могут включать, но без ограничения, коды, буквы, слова, имена, буквенно-цифровые коды, числа, изображения, штрих-коды, коды быстрого ответа (QR), метки, трекеры, такие как трекер-метки Smart Tracker Tags или Bluetooth-трекеры, и /или любой индикатор, известный в данной области техники. В некоторых вариантах осуществления индикаторы могут быть напечатаны, протравлены и/или приклеены к поверхности компонента набора. Например, индикаторы могут быть напечатаны непосредственно на поверхности по меньшей мере одного компонента набора, как показано на ФИГ. 12В. Индикаторы также могут быть размещены на пакете с помощью клея, например, наклейка или трекер могут быть размещены на пакете и/или на нескольких пакетах. Например, как показано на ФИГ. 12В, пакет 22 включает несколько индикаторов 28 (числовой код), 27 (QR-код).

На ФИГ. 12С показан вид в перспективе пакета для использования в качестве пакета для сбора тканей. Ткань может быть помещена в пакет 22 для обработки. Индикаторы можно использовать для идентификации пациента, у которого был взят или получен образец ткани и/или биопсия. Как показано на ФИГ. 12С, индикаторы 27, 28 включают QR-код и идентификационный номер, используемые для отслеживания образца, определения местоположения образца и/или отслеживания статуса образца в процессе. Например, в некоторых вариантах осуществления индикаторы можно использовать для определения местоположения образца в любом заданном месте в лаборатории. Индикаторы могут быть размещены на пакете до и/или во время использования, например, когда пакет вынимают для использования с образцом, индикаторы пациента могут быть отпечатаны на пакете. Кроме того, пакет 22 может

иметь метку 29. Метки могут использоваться для указания того, где должны располагаться сварные швы, зажимы и/или инструменты.

Индикаторы, например QR-коды, метки, такие как смарт-теги, и/или трекеры, могут быть использованы для идентификации образца в пакете, а также для указания процессору устройства, чтобы устройство запускало конкретную программу в соответствии с типом процессов дезагрегации, обогащения и/или стабилизации, проводимых в наборах для криоконсервации. В этих процессах могут быть использованы различные типы сред, например, ферментные среды, среды для расщепления опухолей и/или среды для криоконсервации, которые могут обеспечивать контролируемую скорость замораживания. В некоторых вариантах осуществления набор для криоконсервации и/или его компоненты могут включать индикаторы, которые могут считываться автоматизированным устройством. Затем устройство может исполнять специальный полностью автоматизированный способ обработки ткани при помещении в такое устройство. Изобретение является особенно полезным при обработке образцов, в частности, автоматизированной обработке.

В некоторых случаях набор для криоконсервации и/или его компоненты, описанные в настоящем документе, могут быть одноразовыми. Наборы для криоконсервации и/или его компоненты могут быть использованы в автоматизированном и/или полуавтоматизированном процессе дезагрегации, обогащения и/или стабилизации клеток или клеточных агрегатов. В некоторых вариантах осуществления пакеты для использования в наборе для криоконсервации, такие как пакет для сбора, в некоторых вариантах осуществления могут использоваться для нескольких процессов. Например, пакеты для сбора могут быть многократно запечатаны в разных местах для создания отдельных отделений для обработки образца ткани, такого как образец, полученный путем биопсии, и/или образец солидной ткани.

Кроме того, метки могут быть размещены в различных местах на пакетах, таких как пакеты для сбора ткани, для указания того, что пакеты могут быть запечатаны, соединены зажимом и/или прикреплены к объекту. В некоторых вариантах осуществления метки, указывающие на то, что пакет соединен зажимом, запечатан и/или прикреплен к объекту, такому как прибор, могут быть размещены на пакете перед использованием. Например, одна или несколько меток могут быть расположены на пакете во время изготовления.

В некоторых вариантах осуществления пакет или гибкий контейнер может выдерживать силу в 100 ньютонов во время использования, если он должным образом

запечатан и дополнительно закреплен зажимом при размещении внутри устройства для обработки и/или переработки. Вариант осуществления пакета или гибкого контейнера может быть сконструирован таким образом, чтобы выдерживать силу в 75 ньютонов во время использования, если он должным образом запечатан и дополнительно закреплен зажимом при размещении внутри устройства для обработки и/или переработки.

При формировании герметичных соединений или сварных швов на гибком контейнере, таком как пакет, например, пакет для сбора и/или пакет для криоконсервации, может быть использовано запечатывающее устройство для подачи тепла и/или давления при предварительно определенной температуре, давлении и количестве времени в зависимости от материала, используемого в пакете. Например, для некоторых термосварочных аппаратов может потребоваться применение тепла и давления в течение примерно восьми секунд. Через 8 секунд нагрев устройства может быть отключен, однако еще на 2-3 секунды может быть приложено давление.

На ФИГ. 12D показан вид в перспективе варианта осуществления пакета для сбора ткани для запечатывания в нем ткани для обработки согласно изобретению. Индикаторы 27, 28 расположены на пакете 22 таким образом, чтобы пользователь мог легко идентифицировать пациента во время использования. Кроме того, эти индикаторы можно использовать для идентификации материалов в пакетах, а также для отслеживания прогресса во время конкретного способа обработки материалов в пакетах. В некоторых вариантах осуществления пакет содержит объем среды в диапазоне от примерно 0,1 мл до примерно 25 мл и объем ткани в диапазоне от примерно 0,1 мл до примерно 10 мл в пакете во время обработки. Отношение объема среды к объему ткани в пакете во время обработки должно находиться в диапазоне от примерно 1,0 до примерно 2,5. В некоторых вариантах осуществления отношение объема среды к объему ткани находится в диапазоне от примерно 1,7 до примерно 2,3. В частности, отношение объема среды к объему ткани находится в диапазоне от примерно 2,0 до примерно 2,2.

Как показано на ФИГ. 12D, метки 29 расположены рядом с открытым концом 26 пакета 22. Во время использования метки 29 могут располагаться на пакете в зависимости от способа, используемого для обработки образца ткани и/или образца, полученного путем биопсии. Метки могут быть размещены на пакете во время использования, например, в зависимости от используемого или подлежащего использованию способа обработки и/или используемого оборудования. В некоторых вариантах осуществления метки могут быть нанесены на пакет во время изготовления.

Например, расположение меток для мест запечатывания и/или зажима может варьироваться в зависимости от метода обработки и/или объема обрабатываемой ткани.

На ФИГ. 12Е показан вид в перспективе пакета для сбора ткани. Ткань может быть запечатана в пакете 22. Коннектор 24 может обеспечивать доступ к пакету. Как показано, коннектор 24 может быть соединен с другими устройствами, такими как фильтр, пакеты и т.д., с помощью трубки 25. Отверстия 20 могут быть использованы для отбора проб из пакета 22 и/или вывода материалов из пакета 22 во время использования.

На ФИГ. 13А показан вид спереди пакета, используемого для сбора ткани. Во время использования ткань может быть запечатана внутри пакета. Пакет 30 может быть изготовлен с запечатанным краем 31. Как показано на фиг. 13А, запечатанные края 31 могут быть расположены на трех краях, а четвертый край может включать в себя открытый участок 36.

Позиционеры 33 на пакете 30 могут быть использованы для позиционирования пакета. Например, один или несколько позиционеров могут быть использованы для гарантии того, что пакет будет обработан надлежащим образом во время использования, например, при расположении рядом с устройством. В некоторых системах позиционеры могут облегчить использование описанных в настоящем документе пакетов в автоматизированных системах. В частности, позиционеры могут быть использованы для перемещения пакета через автоматизированную систему.

Как показано на ФИГ. 13В, пакет 30 может иметь индикаторы 36, 37, используемые для идентификации образца, например, индикатор, который идентифицирует пациента, у которого был взят образец ткани или получен путем биопсии. Использование индикатора 37, такого как QR-код, может позволить отслеживать стадии процесса для конкретного образца, так что можно проследить за образцом на протяжении данного процесса.

На ФИГ. 13С показан вид спереди пакета для сбора ткани. Ткань может быть запечатана внутри пакета и обработана и/или переработана внутри него. Пакет 30 может иметь индикаторы 37, 38, используемые для идентификации образца, например, индикатор, который идентифицирует пациента, у которого был взят образец ткани или получен путем биопсии. Использование индикатора 37, такого как QR-код, может позволить отслеживать стадии процесса для конкретного образца, таким образом, что можно проследить за образцом на протяжении всего данного процесса. Позиционеры 33 могут быть использованы для позиционирования пакета 30 для обработки.

Коннектор 34 может позволить ткани, обработанным тканям и т.д. соединяться с другим устройством через трубку 35.

На ФИГ. 13D показан вид спереди пакета для сбора тканей с индикаторами 37, 38, используемыми для идентификации образца. Использование индикатора 37, такого как QR-код, может позволить отслеживать стадии процесса для конкретного образца, таким образом, что можно проследить за образцом на протяжении всего данного процесса. Метки 39 и/или позиционеры 33 могут быть использованы для контроля положения пакета во время переработки и/или обработки. Рядом с открытым концом размещены метки, указывающие, где расположить, запечатать и/или зажать пакет во время использования. Пакет 30 может быть изготовлен с запечатанными краями 31. Как показано на ФИГ. 13D, запечатанные края 31 могут быть расположены на трех краях, а четвертый край может включать открытый участок 36.

На ФИГ. 13E показан вид спереди пакета для сбора ткани, который может быть запаян после помещения в него ткани. Коннекторы 34 и отверстия 32 могут обеспечить доступ к пакету. Одно или несколько отверстий могут быть расположены на пакете для сбора таким образом, чтобы отверстия позволяли вводить среду и/или реагенты, и/или извлекать образец из пакетов.

Как показано, коннектор 34 может быть соединен с другими устройствами, такими как фильтр, пакеты и т.д., с помощью трубки 35. Метки и индикаторы могут быть размещены на одной или нескольких сторонах пакета в зависимости от использования. В частности, как показано, если на ФИГ. 13E позиционеры 33, метки 39 и/или индикаторы 37, 38 могут быть использованы для позиционирования пакета 30 для переработки, такой как применение перемешивания, запечатывания, например, путем термосварки (которая может быть частью инструмента для переработки), дополнительно к материалам для переработки и/или извлечения. Преимущественно перед применением переработки, пакет для сбора зажимают или прикрепляют к инструменту для переработки и/или запечатывают, например, термосваривают.

На ФИГ. 14 показан вид сзади пакета для сбора тканей. В частности, пакет 40 может быть запечатан с помещенной внутрь него и переработанной тканью. Сварной шов может быть расположен рядом с открытым концом 46 и по существу параллельно ему. Как показано, коннектор 44 может быть соединен с другими устройствами, такими как фильтр, пакеты и т.д., с помощью трубки 46. Пакет 40 может быть изготовлен с запечатанным краем 41. Как показано на ФИГ. 14, запечатанные края 41 могут быть

расположены на трех краях, а четвертый край может включать открытый участок 46. Позиционеры 43 могут быть окружены изготовленным запечатанным краем 41.

На ФИГ. 15 показан вид сбоку пакета 50 для использования в сборе тканей, способного запечатывать находящуюся в нем ткань и позволяющего перерабатывать ткань во время использования пакета. Пакет 50 может быть соединен с трубкой 54 с помощью коннектора 52.

На ФИГ. 16А показан вид сверху незапечатанного пакета для сбора ткани. Пакет 60 может включать запечатанные части 66 и открытую часть 64. Коннектор 62 виден через пакет 60. Открытая часть верхней части пакета 60 может быть запечатана после помещения ткани в пакет.

На ФИГ. 16В показан вид снизу пакета 60 для сбора ткани, имеющего запечатанные края 66 для запечатывания внутри него ткани для переработки. Коннектор 62 виден на пакете 60.

На ФИГ. 17А показан вид сверху частично открытого пакета. Пакет 70 может включать запечатанные части 76 и открытую часть 74. Коннектор 72 виден через пакет 70. После помещения ткани в мешок открытая часть верхней части пакета 70 может быть запечатана.

На ФИГ. 17В показан вид снизу пакета для сбора ткани для запечатывания внутри него ткани для переработки. Коннектор 72 виден на пакете 70.

На ФИГ. 18А показан вид сверху частично открытого пакета. Ткань можно ввести через открытый конец 84 пакета 80. Коннектор 82 показан расположенным на дне пакета 80.

На ФИГ. 18В показан вид сверху полностью открытого пакета для сбора и/или переработки ткани. В открытый конец 84 пакета 80 можно вводить ткань для переработки, такой как обработка, выделение и/или отделение. Запечатанные края 86 могут быть созданы во время изготовления.

На ФИГ. 19А показан вид сверху частично открытого пакета 90 с запечатанными краями 96 по бокам пакета. Как показано, ткань может быть введена через открытый конец 94 пакета 90. Коннектор 92 показан расположенным на дне пакета 90.

На ФИГ. 19В показан вид сверху полностью открытого пакета для сбора и/или переработки тканей с запечатанными краями 96 по бокам мешка. В открытый конец 94 пакета 90 можно вводить ткань для переработки, такой как обработка, выделение и/или разделение. Коннектор 92 показан расположенным на дне пакета 94.

На ФИГ. 20А-20Е показан вид спереди вариантов осуществления пакетов для сбора тканей. Как показано на ФИГ. 20А, пакет 100 с запечатанными краями 101 и открытым концом 102 может быть соединен с устройствами (не показаны) через трубку 105 и/или коннекторы 104. Например, коннектор 104 расположен в пакете 100, тогда как Y-образные коннекторы 106 могут быть расположены вдоль трубки. На ФИГ. 20В показан дополнительный вариант осуществления пакета 100, включающий индикаторы 107, 108, позволяющие пользователю идентифицировать пациента, у которого был взят образец ткани или получен путем биопсии.

Кроме того, на ФИГ. 20С изображен вариант осуществления пакета 100, который включает метку 109 и индикаторы 107, 108. Использование позиционеров 103 может обеспечить согласованное позиционирование пакетов, что позволяет последовательно перерабатывать ткань внутри пакетов. Индикаторы 107, 108 идентифицируют образцы с информацией об образце и/или пациенте. В некоторых случаях индикаторы могут быть использованы для идентификации и/или отслеживания образца, такого как образец ткани и/или образец, полученный путем биопсии. На ФИГ. 20D изображен пакет 100, имеющий несколько индикаторов 107, 108 и метки 109. Метки могут указывать места, где пакет 100 должен быть запечатан. Например, метки 109 могут указывать места, где пакет 100 должен быть запечатан, зажат и/или соединен с другим устройством. Метки для запечатывания могут быть расположены вблизи открытого края пакета, например, такие метки могут быть расположены на заданном расстоянии от открытого края. В некоторых вариантах осуществления метки для запечатывания могут быть по существу параллельны открытому краю. Как показано, пакет 100 может включать коннектор 104 и трубку 105.

В одном варианте осуществления, показанном на ФИГ. 20Е, пакет 100 включает отверстия 110 и коннектор 104. Отверстия могут обеспечивать возможность внесения материалов и/или удаления материала из образца. Например, во время переработки ткани образцы могут браться несколько раз на протяжении всей переработки. Кроме того, отверстия 110 могут обеспечивать асептическую подачу среды и/или реагентов в пакет 100.

На ФИГ. 21А показан вид спереди пакета 100 для сбора и/или переработки ткани. Ткань можно поместить в пакет 100 через открытый конец 102. Коннектор 104 можно использовать для соединения пакета 100 с трубкой 105 и зажимом 112.

На ФИГ. 21В-21Е показаны виды спереди дополнительных вариантов осуществления пакета 100. На ФИГ. 21В-11D показаны различные конфигурации,

включая индикаторы 107, 108 и/или метки 109. Пакеты могут содержать индикаторы, такие как коды, буквы, слова, имена, буквенно-цифровые коды, числа, изображения, штрих-коды, коды быстрого ответа (QR), метки, трекеры, такие как смарт-метки трекера или Bluetooth-трекеры, и/или любой индикатор, известный в данной области техники. В некоторых вариантах осуществления индикаторы могут быть напечатаны, протравлены и/или приклеены к поверхности компонента набора. Индикаторы также могут быть размещены на пакете с помощью клея, например, наклейка или трекер могут быть размещены на пакете и/или на нескольких пакетах. Пакеты для сбора и/или набор для криоконсервации могут включать несколько индикаторов, таких как числовые коды и/или QR-коды.

Индикаторы, например QR-коды, метки, такие как смарт-теги, и/или трекеры, могут быть использованы для идентификации образца в пакете, а также для указания процессору устройства, чтобы устройство запускало конкретную программу в соответствии с типом процессов дезагрегации, обогащения и/или стабилизации, проводимых в наборах для криоконсервации.

На ФИГ. 21Е показан вид спереди другого варианта осуществления пакета 100, используемого для переработки, обработки и/или выделения материалов. Ткань, подлежащая обработке, может быть запечатана внутри пакета 100. Трубка 105 может соединять пакет 100 через коннектор 104 с зажимом 112. Отверстия 114 могут обеспечивать введение и/или извлечение из пакета 100. Например, отверстия позволяют брать образцы и/или позволять асептическое введение среды и/или реагентов в гибкий контейнер, такой как пакет из набора для криоконсервации.

На ФИГ. 22А показан вид спереди другого варианта осуществления пакета 120 для сбора ткани, имеющего запечатанный край 121 для запечатывания внутри него ткани для переработки. Пакет 120 содержит позиционер 123 и коннектор 124, соединенный с трубкой 125.

На ФИГ. 22В показан вид спереди пакета 120 для сбора ткани с запечатанными краями 121 и открытым концом 122. Индикаторы 127, 128 могут быть расположены на пакете 120 таким образом, чтобы автоматизированная система могла получить к ним легкий доступ. Отверстия, определяющие позиционеры 123, могут быть окружены запечатанными краями 121. Индикаторы могут быть использованы для идентификации пациента, у которого был взят образец ткани или получен путем биопсии.

Как показано на ФИГ. 22С, пакет 120 включает индикаторы 127, 128 и метку 129. На ФИГ. 22D показан пакет 120 для сбора, имеющий несколько меток 129. Метки

для запечатывания могут располагаться вблизи открытого края пакета. Такие метки могут располагаться на заданном расстоянии от открытого края. Метки для запечатывания могут быть по существу параллельны открытому краю в некоторых вариантах осуществления.

На ФИГ. 23 показан вид спереди запечатанного пакета 130, расположенного таким образом, что дно пакета 130 показано вверх страницы с трубкой 135, выходящей из коннектора 134. Пакет 130 включает индикатор 137 на запечатанной части 131 пакета 130. Индикатор на запечатанной части может быть расположен во время и/или после запечатывания пакета 130. Как правило, пакет запечатывается после введения ткани. Индикатор 138 на поверхности пакета 130 может представлять собой штрих-код. Позиционеры 133 могут быть расположены рядом с коннектором 134.

Пакеты, такие как пакеты для сбора и/или пакеты для криоконсервации, и любые связанные с ними трубки могут быть, как правило, светлыми, прозрачными, полупрозрачными и любого желаемого цвета или их комбинацией. Пакеты для сбора ткани и/или трубки могут, как правило, изготавливаться способами, аналогичными изготовлению закрытых и/или запечатанных пакетов для крови и/или криоконсервации и связанных с ними трубок. Трубка в изобретении может быть изготовлена из любого желаемого материала, включая, но без ограничения, поливинилхлорид (PVC). Например, желательным материалом может быть PVC, поскольку PVC лучше всего подходит для сварки и/или запечатывания.

Пакет для сбора ткани, такой как пакет для сбора ткани по изобретению, может включать по меньшей мере часть пакета для приема ткани, изготовленного из заранее определенного материала, такого как полиолефиновый полимер, этиленвинилацетат (EVA), сополимеры, такие как смесь винилацетата и полиолефинового полимера (например, пленка OriGen Biomedical EVO), и/или материал, который включает EVA. Материалы для использования в пакете могут быть выбраны по определенному свойству и/или набору свойств, например, пригодности для герметизации, такой как термосвариваемость, газопроницаемость, гибкость, например, гибкость при низких температурах, эластичность, например, эластичность при низких температурах, химическая стойкость, оптическая прозрачность, биосовместимость, такая как цитотоксичность, гемолитическая активность, устойчивость к выщелачиванию, низкое содержание твердых частиц.

Как показано на ФИГ. 24, пакет 140 может иметь несколько меток 141, 142, которые размещены таким образом, что, если области, содержащие метки, запечатаны,

в пакете 140 могут быть образованы отделения 143. Пакет 140 имеет предварительно сваренные участки 145, которые формируются во время изготовления пакета, которые могут быть использованы при формировании отделений для образцов во время использования. На ФИГ. 24 показан вариант осуществления пакета для сбора, который может быть выполнен таким образом, что он имеет несколько отделений. Каждое отделение может быть сформировано в пакете путем размещения нескольких швов и/или сварных швов (например, термосварных). Например, после помещения опухолевой суспензии в пакет для сбора, открытый конец может быть сварен, а дополнительные метки 141, такие как линии сварки 142, могут быть сварены с использованием энергии, такой как тепло, для образования отделений.

Позиционеры 143 на пакете 140 обеспечивают правильное расположение пакета по отношению к инструментам, таким как запаивающие устройства, такие как радиочастотные термосварочные аппараты и/или инъекторы.

Сварные швы могут быть образованы во время использования энергии, например тепла, для создания зоны сварки. Швы, образованные во время использования, могут иметь ширину в диапазоне от примерно 2,5 мм до примерно 7,5 мм. Как правило, шов 140 формируется после помещения тканевого материала в пакет 140 и может иметь ширину примерно 5 мм.

Сварные швы могут быть испытаны на прочность с использованием испытания на расслаивание сварного шва (например, ASTM F88/F88M) и/или испытания на разрыв (например, ASTM F1140/F1140M или ASTM F2051/F2054M).

В некоторых вариантах осуществления пакет или гибкий контейнер может выдерживать силу в 100 ньютонов во время использования, если он должным образом запечатан и дополнительно закреплен зажимом при размещении внутри устройства для обработки и/или переработки. Вариант осуществления пакета или гибкого контейнера может быть сконструирован таким образом, чтобы выдерживать силу в 75 ньютонов во время использования, если он должным образом запечатан и дополнительно закреплен зажимом при размещении внутри устройства для обработки и/или переработки.

При формировании швов или сварных швов на гибком контейнере, таком как пакет, например, пакет для сбора и/или пакет для криоконсервации, может использоваться запечатывающее устройство для приложения тепла и/или давления при предварительно определенной температуре, давлении и количестве времени в зависимости от материала, используемого в пакете. Например, для некоторых термосварочных аппаратов может потребоваться применение тепла и давления в

течение примерно восьми секунд. Через 8 секунд нагрев устройства может быть отключен, однако еще на 2-3 секунды может быть приложено давление.

В некоторых системах позиционеры могут облегчать использование описанных в настоящем документе пакетов в автоматизированных системах. Таким образом, ткани, которые были помещены в пакет 140, могут быть разделены в отдельные отделения 144, 146, 147. Как показано, каждое отделение 144, 146, 147 включает отверстия 148, 149, 150, соответственно. Каждое отверстие может обеспечить прямой доступ в отделения. Это может позволить индивидуальное добавление, хранение и/или тестирование образцов. Например, запечатанный пакет для сбора может облегчить хранение и тестирование ТП на пригодность и/или микробиологические свойства сложных образцов. Поскольку для этого типа тестирования может потребоваться замораживание небольшой аликвоты расщепленного материала в пакете для сбора, чтобы небольшую аликвоту расщепленного материала можно было разморозить отдельно. В некоторых вариантах осуществления пакет 140, как показано на ФИГ. 24 можно использовать как пакет для сбора и/или пакет для криоконсервации.

На ФИГ. 25 показан вид спереди варианта осуществления пакета для сбора. В этом варианте осуществления пакет для сбора 152 имеет длину примерно 150 мм (т.е. 15 см) и ширину примерно 90 мм (т.е. 9 см). Пакет 152 имеет отверстия, действующие в качестве позиционеров 160. Один или несколько позиционеров могут быть использованы для контроля ориентации пакета, чтобы гарантировать правильное расположение пакета для переработки и/или обработки во время использования, например, позиционирование рядом с инструментом. В некоторых системах позиционеры могут облегчить использование описанных в настоящем документе пакетов в автоматизированных системах. В частности, позиционеры могут быть использованы для перемещения пакета через автоматизированную систему. Шов 156 составляет примерно 5 мм. Сварные швы могут быть образованы во время использования энергии, например тепла, для создания зоны сварки. Швы, образованные во время использования, могут иметь ширину в диапазоне от примерно 2,5 мм до примерно 7,5 мм. Как правило, шов 156 формируется после помещения тканевого материала в пакет 152. Как показано на ФИГ. 25, пакет 152 имеет предварительно сваренные участки 158, которые формируются во время изготовления пакета.

Как показано на ФИГ. 26, пакет для сбора может быть соединен с трубкой и клапаном. В некоторых вариантах осуществления пакеты могут иметь длину в

диапазоне от примерно 10 см до примерно 50 см. В частности, пакеты для использования в описанном в настоящем документе изобретении могут иметь длину в диапазоне от примерно 15 см до примерно 30 см. Например, пакеты могут иметь длину в диапазоне от примерно 18 см до примерно 22 см. Пакет 162, как показано на фиг. 26, имеет длину примерно 20 см. Пакеты для сбора для использования, как описано в настоящем документе, могут иметь ширину в диапазоне от примерно 6,8 см до примерно 8,8 см. Как показано на ФИГ. 26, пакет для сбора 162 имеет ширину примерно 7,8 см. Клапаны, включая, но без ограничения, безыгольные клапаны, могут быть использованы в точках вдоль трубок. Например, безыгольный клапан 164 расположен примерно в 20 см от пакета 162, соединенного трубкой 166. Трубка 166 проходит от безыгольного клапана 164 по меньшей мере на 10 см до добавления другого элемента или компонента.

Как показано на ФИГ. 27А, открытый пакет 170 соединяют с трубкой 172, 174, 176 перед использованием. Пакет 170 может быть изготовлен из запечатываемого материала. В частности, пакеты могут быть запечатаны с помощью аппарата для термосварки, такого как, например, настольный аппарат для термосварки. Некоторые трубки, например трубка 174, могут быть несвариваемыми. Клапаны, включая, но без ограничения, безыгольные клапаны, могут быть использованы в точках вдоль трубок. Например, безыгольные клапаны 178 расположены на концах трубок 174, 176.

В некоторых вариантах осуществления пакеты могут иметь длину в диапазоне от примерно 10 см до примерно 50 см. В частности, пакеты для использования в описанном в настоящем документе изобретении могут иметь длину в диапазоне от примерно 15 см до примерно 30 см. Например, пакеты могут иметь длину в диапазоне от примерно 18 см до примерно 22 см. Пакет 170, как показано на ФИГ. 27А имеет длину примерно 20 см.

На ФИГ. 27В показан вид спереди варианта осуществления пакета для сбора, который был запечатан, например, после помещения материала внутрь пакета. Пакет 180 выполнен из запечатываемого материала. В частности, пакеты могут быть запечатаны с помощью аппарата для термосварки, такого как, например, настольный аппарат для термосварки. Швы могут располагаться вблизи открытого края пакета, в некоторых случаях метки могут располагаться на предварительно определенном расстоянии от открытого края. В некоторых вариантах осуществления швы могут быть по существу параллельными открытому краю.

Некоторые трубки, например трубки 182, 184, 186, могут быть свариваемыми. Свариваемые трубки могут быть изготовлены из полимерного материала, например поливинилхлорида (PVC).

Клапаны, включая, но без ограничения, безыгольные клапаны, могут быть использованы в точках вдоль трубок. Например, безыгольные клапаны 188 расположены на концах трубок 184, 186. В некоторых вариантах осуществления пакеты могут иметь длину в диапазоне от примерно 10 см до примерно 40 см. В частности, пакеты для использования в описанном в настоящем документе изобретении могут иметь длину в диапазоне от примерно 15 см до примерно 30 см. Например, пакеты могут иметь длину в диапазоне от примерно 18 см до примерно 22 см. Пакет 180, как показано на ФИГ. 27А имеет длину примерно 20 см.

Как показано на ФИГ. 28, вариант осуществления набора для криоконсервации показан обращенным вверх и включает открытый пакет 190 и пакет для криоконсервации 192. Как показано, пакет для криоконсервации 192 может иметь индикаторы 193, 194. Пакеты для криоконсервации могут быть пригодны для криоконсервации с криопротектором, таким как диметилсульфоксид («DMSO»). В некоторых вариантах осуществления пакеты для криоконсервации могут быть сконструированы таким образом, чтобы пакеты могли вмещать объем материала в диапазоне от примерно 5 мл до примерно 45 мл. В частности, пакет для криоконсервации может вмещать объем материала в диапазоне от примерно 10 мл до примерно 35 мл. Например, некоторые варианты осуществления включают пакеты для криоконсервации, которые могут вмещать объем материала, подлежащего хранению, в диапазоне от примерно 15 мл до примерно 30 мл. Размер пакета 192 для криоконсервации может быть таким, чтобы был достигнут желаемый заданный объем. В некоторых вариантах осуществления пакет для криоконсервации может иметь ширину в диапазоне от примерно 4 см до примерно 11 см и длину в диапазоне от примерно 10 см до примерно 18 см. Например, пакет для криоконсервации может иметь ширину в диапазоне от примерно 5,8 см до примерно 9,8 см и длину в диапазоне от примерно 12 см до примерно 16 см. В частности, вариант осуществления пакета для криоконсервации, показанный на ФИГ. 28, может иметь ширину примерно 7,8 см и длину примерно 14 см.

Перед использованием набор для криоконсервации и/или его определенные компоненты могут быть подвергнуты стерилизации. Например, пакеты 190, 192 могут быть стерилизованы. Материалы, используемые для изготовления пакетов 190, 192,

могут быть термосвариваемыми. Материалы для использования в пакетах могут включать, но без ограничения, полимеры, такие как EVA, полиамиды (например, нейлон) и их комбинации. Открытый пакет 190 может быть использован для переработки и/или дезагрегации после закрытия пакета с помощью сварного шва и/или зажима (не показано).

Комплект 191 дополнительно включает клапаны 195, 196, зажимы 197, 198, трубки 199 и фильтр 200. Фильтр 200 может представлять собой встроенный фильтр, фильтр для крови, такой как фильтр для введения крови, биологический фильтр и/или встроенный фильтр для удаления комков. Фильтр может быть выполнен с возможностью удаления материалов из перерабатываемой ткани сверх заданного размера с получением желаемого материала. Например, комки ткани могут быть отделены от дезагрегированной ткани с помощью фильтра. В частности, тканевая композиция, поступающая в трубки после фильтрации, может содержать компоненты, имеющие средний размер менее чем примерно 200 мкм, таким образом, образуется желаемый материал. Например, желаемый материал может включать ТП (лимфоциты, инфильтрирующие опухоль), имеющие средний размер менее чем примерно 170 мкм.

Фильтр может быть выбран таким образом, чтобы перерабатываемая композиция ткани, поступающая из трубки, могла быть обогащена таким образом, что после фильтра желаемый материал течет в трубку в направлении стабилизирующего элемента, содержащего компоненты, имеющие размер в диапазоне от примерно 15 мкм до примерно 500 мкм. В некоторых вариантах осуществления фильтр может быть выполнен таким образом, что тканевая композиция, поступающая в трубку в направлении стабилизирующего элемента после фильтрации, содержит компоненты, имеющие размер в диапазоне от около 50 мкм до около 300 мкм. Например, в одном варианте осуществления фильтр может быть выполнен таким образом, что тканевая композиция, поступающая в трубку после фильтрации, содержит компоненты, имеющие размер в диапазоне от примерно 150 мкм до примерно 200 мкм.

В некоторых вариантах осуществления фильтр элемента обогащения может удалять материалы из перерабатываемой ткани за пределами заданного диапазона размеров от примерно 5 мкм до примерно 200 мкм с образованием желаемого материала. Например, желаемый материал может включать ТП (лимфоциты, инфильтрирующие опухоль), имеющие средний размер в диапазоне от примерно 5 мкм до примерно 200 мкм. Клапаны 195, 196 могут быть размещены на заданном расстоянии от пакета для сбора. Например, безыгольный клапан 195 может быть

расположен примерно в 20 см от пакета для сбора 190. Клапаны, такие как безыгольные клапаны, могут быть использованы для добавления материалов в пакет для сбора 190. Например, ферментная среда может быть вставлена в безыгольный клапан 195 для введения среды в пакет для сбора 190.

В некоторых вариантах осуществления после такого клапана может иметься предварительно определенное количество трубок для обеспечения пространства для приваривания дополнительных компонентов набора для криоконсервации. Например, после некоторых клапанов перед следующим элементом может быть расположено не менее десяти (10) см трубки. Трубка 199 может быть запечатываемой и/или свариваемой. Например, материалы для трубок могут включать, но без ограничения, PVC (поливинилхлорид) и/или другие материалы, известные в данной области. В некоторых вариантах осуществления размеры трубок могут подходить к коннекторам. Например, трубка может иметь внутренний диаметр в диапазоне от примерно 1,5 мм до примерно 4,5 мм и внешний диаметр в диапазоне от примерно 2,1 мм до примерно 6,1 мм. Например, вариант осуществления набора для криоконсервации может включать трубку, имеющую внутренний диаметр в диапазоне от примерно 2,9 мм до примерно 3,1 мм и внешний диаметр в диапазоне от примерно 4,0 мм до примерно 4,2 мм. Трубки, используемые в наборе 191 для криоконсервации, могут различаться по длине, при этом отдельные элементы трубок имеют длину в диапазоне от примерно 1 см до примерно 30 см. Например, как показано на ФИГ. 28 длина отдельных трубчатых элементов может варьироваться от примерно 5 см до примерно 20 см.

Зажимы 197, 198, как показано на ФИГ. 28, могут быть использованы для препятствия и/или предотвращения движения ферментной среды и/или расщепленной ткани в фильтр. Например, зажим 197 может быть использован для препятствия и/или предотвращения движения ферментной среды и/или расщепленной ткани в фильтр до желаемой стадии фильтрации. Зажим 198 может препятствовать и/или предотвращать нежелательное движение криозащитного агента в фильтр.

На ФИГ. 29 показан вид сверху варианта осуществления набора для криоконсервации, аналогичного набору 191, показанному на ФИГ. 28, однако набор 201 обращен вниз. На ФИГ. 29 показано положение, в котором пакет для сбора 202 может быть закрыт.

На ФИГ. 30 показан вид сверху варианта осуществления набора для криоконсервации, обращенного вверх, включающего закрытый пакет для сбора 206 и пакет для криоконсервации 208. В некоторых вариантах осуществления пакет 208 для

криоконсервации может иметь отверстия 215, 216, которые позволяют брать образцы, обеспечивать возможность асептического ввода среды и/или реагентов в пакет для криоконсервации. Набор 205 для криоконсервации может включать фильтр 214, клапаны 209, 210, зажимы 211, 212 и трубки 222.

Фильтр 214 может представлять собой встроенный фильтр, биологический фильтр, фильтр для крови, такой как фильтр для введения крови, и/или встроенный фильтр для удаления комков. Фильтр может быть выполнен с возможностью удаления материалов сверх заданного размера. Например, комки ткани можно отделить от дезагрегированной ткани с помощью фильтра. Фильтр может быть выбран таким образом, чтобы тканевая композиция, поступающая в трубку после фильтра, могла содержать компоненты, имеющие размер в диапазоне от примерно 15 мкм до примерно 500 мкм. В некоторых вариантах осуществления фильтр может быть сконфигурирован таким образом, что тканевая композиция, поступающая в трубку после фильтрации, содержит компоненты, имеющие размер в диапазоне от примерно 50 мкм до примерно 300 мкм. Например, в одном варианте осуществления фильтр может быть сконфигурирован таким образом, что тканевая композиция, поступающая в трубку после фильтрации, содержит компоненты, имеющие средний размер в диапазоне от примерно 150 мкм до примерно 200 мкм. В частности, тканевая композиция, поступающая в трубку после фильтрации, может содержать компоненты, имеющие средний размер менее чем примерно 170 мкм.

Клапаны 209, 210 могут быть размещены на заданном расстоянии от пакета для сбора. Например, безыгольный клапан 209 может быть расположен примерно в 20 см от пакета для сбора 206. Клапаны, такие как безыгольные клапаны, могут быть использованы для внесения материалов в пакет для сбора 206. Например, ферментная среда может быть вставлена в безыгольный клапан 209, чтобы ввести носитель в пакет для сбора 206.

В некоторых вариантах осуществления после такого клапана может иметься заданное количество трубок для обеспечения пространства для приварки дополнительных компонентов набора для криоконсервации. Например, после некоторых клапанов перед следующим элементом может быть расположено не менее десяти (10) см трубки. Трубка 222 может быть запечатываемой и/или свариваемой. Например, материалы для трубок могут включать, но без ограничения, PVC и/или другие материалы, известные в данной области. В некоторых вариантах осуществления размеры трубок могут подходить к коннекторам. Например, трубка может иметь

внутренний диаметр в диапазоне от примерно 1,5 мм до примерно 4,5 мм и внешний диаметр в диапазоне от примерно 2,1 мм до примерно 6,1 мм. Например, вариант осуществления набора для криоконсервации может включать трубку, имеющую внутренний диаметр в диапазоне от примерно 2,9 мм до примерно 3,1 мм и внешний диаметр в диапазоне от примерно 4,0 мм до примерно 4,2 мм. Трубки, используемые в наборе 205 для криоконсервации, могут различаться по длине, при этом отдельные элементы трубок имеют длину в диапазоне от примерно 1 см до примерно 30 см. Например, как показано на ФИГ. 30, длина отдельных трубчатых элементов может варьироваться от примерно 5 см до примерно 20 см.

Зажим 211, 212, как показано на ФИГ. 30, можно использовать для препятствия и/или предотвращения движения ферментной среды и/или расщепленной ткани в фильтр. Например, зажим 211 можно использовать для препятствия и/или предотвращения перемещения раствора фермента в среде и/или расщепленной ткани в фильтр до желаемой стадии фильтрации. Зажим 212 может препятствовать и/или предотвращать нежелательное перемещение криозащитного агента в фильтр.

На ФИГ. 31 показан вид сбоку варианта осуществления набора для криоконсервации, обращенного вверх, который включает закрытый пакет для сбора 226 и пакет для криоконсервации 228. Пакет для криоконсервации 228 может иметь отверстие 242. Отверстие 242 обеспечивает доступ к пакету для криоконсервации 228. Клапаны 232, 238 и зажимы 234, 236 могут быть расположены вокруг фильтра 230 и использованы для управления движением жидкости внутри набора 224 для криоконсервации.

На ФИГ. 32 показан вид с торца варианта осуществления набора для криоконсервации. Запечатанный пакет 226 и фильтр 230 являются визуально видимыми. Герметичный пакет 226 может быть соединен с фильтром 230 с помощью трубок, клапанов и/или зажимов.

На ФИГ. 33 показан вид сверху варианта осуществления пакета для сбора. Пакет 232 показан открытым и включает индикаторы 234, 236 и метки 238, 240. Метки могут быть использованы, чтобы показать, где части пакета должны быть запечатаны и/или зажаты. Метки для запечатывания могут располагаться вблизи открытого края пакета. Такие метки могут располагаться на заданном расстоянии от открытого края. Метки для запечатывания могут быть по существу параллельны открытому краю в некоторых вариантах осуществления.

Пакет 232 включает позиционеры 244 и коннектор 246. Коннектор 246 соединяет пакет 232 с трубкой 248. Коннектор 246 может обеспечить возможность разделения трубки 248 на трубки 250, 252, которые включают зажимы 254, 256 и/или отверстия 258, 260.

На ФИГ. 34 показан вид спереди варианта осуществления набора для криоконсервации, который включает пакет для сбора 264, зажимы 266, 268, фильтр 270, трубку 272, отверстия 274, 276, клапаны 278, коннектор 280 и пакет для криоконсервации 282. Пакет для сбора и связанная трубка могут быть сформированы с использованием по меньшей мере некоторого количества материала EVA. В некоторых вариантах осуществления пакет для сбора и/или трубка могут быть изготовлены из EVA. Зажимы 266, 268 могут представлять собой распорно-клиновые зажимы. Коннектор 280 представляет собой четырехходовой коннектор и может быть использован для соединения трубки от фильтра 270 с клапанами 278, например, безыгольными клапанами, а также с трубкой, соединенной с пакетом для криоконсервации 282.

На ФИГ. 35 показан вид спереди варианта осуществления набора для криоконсервации, который включает пакет для сбора 284, отверстия 286, зажимы 288, 296, клапаны 290, 292, фильтр 298 и пакет для криоконсервации 294. Как показано, клапаны 290, 292 могут представлять собой безыгольные клапаны, способные принимать материалы для использования в комплекте во время переработки. Например, материалы, подаваемые через клапаны 290, 292, включают, например, среду для расщепления опухоли и/или среду для криопротектора или криоконсервации, такую как диметилсульфоксид («DMSO») и/или его растворы, такие как среды для криоконсервации, содержащая 55% DMSO и 5% декстрана (например, BloodStor 55-5). Шприцы 300, 302 можно использовать для подачи среды для расщепления опухоли и 55% раствора DMSO, например, среды для криоконсервации, содержащей 55% DMSO и 5% декстрана, соответственно, через безыгольные клапаны 290, 292. Во время переработки материалы могут выборочно подаваться в набор для криоконсервации в заранее определенное время. Кроме того, зажимы могут быть использованы для контроля потока вводимых материалов, таких как среда для расщепления опухоли, и/или криопротектор, такой как раствор DMSO, может быть введен в устройства, такие как пакет для сбора, фильтр и/или пакет для криоконсервации в заранее установленное время.

На ФИГ. 36А показан вид спереди варианта осуществления набора для криоконсервации, который можно закрепить в устройстве, таком как дигестор. Как показано, пакет для сбора 304 при использовании по меньшей мере частично помещен в кронштейн 306. Кронштейн может расположить пакет для сбора 304 таким образом, чтобы переработка могла происходить эффективным образом. На ФИГ. 36А показан пакет для сбора 304, который имеет сварной шов 310 и использует зажим 312 вблизи сварного шва 310 во время использования для снижения давления на сварной шов 310. Ткань, введенная во время использования, может быть распределена по существу равномерно в пакете для сбора 304, таким образом, что ткань может быть обработана с помощью лопастей 314, 316 из устройства. Пакет 330 для криоконсервации имеет несколько отделений 332, каждое из которых имеет собственное отверстие 334.

На ФИГ. 36В показан вид сбоку варианта осуществления пакета для сбора, закрепленного с помощью кронштейна. Кронштейн 336 может быть использован для крепления пакета для сбора. Кронштейн 336 включает шарнир 338, верхнюю сторону 340, нижнюю сторону 342, зажим 344, выступ 346 и защёлку 348. Во время использования зажим 344 может располагаться рядом со сварным швом на пакете для сбора (ФИГ. 36А). Выступ 346 на кронштейне 336 сконструирован таким образом, что он будет располагаться рядом с поверхностью пакета для сбора и выступать в пакет для сбора во время использования. В некоторых вариантах осуществления выступ 346 может уменьшать и/или препятствовать перемещению ткани и/или среды во время использования, чтобы гарантировать по существу одинаковую переработку ткани по длине пакета для сбора. Например, выступ может быть сконструирован таким образом, чтобы он уменьшал и/или препятствовал скольжению тканей между лопастями (показано на ФИГ. 36А). Кронштейн 336 может также включать защёлку 348 для обеспечения надежной фиксации пакета для сбора.

На ФИГ. 36С показан зажим 344 в разобранном виде, включая ребра 350, для использования с пакетом для сбора. В частности, во время использования зажим 344 может быть расположен рядом со сварным швом на мешке для сбора, чтобы снизить риск нарушения сварного шва и/или запечатывания.

На ФИГ. 37 показан вид сверху варианта осуществления набора для криоконсервации, который включает пакет 354 для сбора, фильтр 356, клапаны 362, 364, зажимы 358, 360, трубку 368 и пакет 366 для криоконсервации. Длина трубки между различными компонентами набора 352 для криоконсервации может отличаться.

На ФИГ. 38 показан вариант осуществления набора для криоконсервации, расположенного лицевой стороной вниз, который включает пакет 354 для сбора, фильтр 356, клапаны 362, 364, зажимы 358, 360, трубку 368 и пакет 366 для криоконсервации.

Два или более пакетов могут быть соединены вместе, чтобы гарантировать надлежащее хранение дезагрегированного материала продукта в конкретном варианте осуществления.

В некоторых вариантах осуществления изобретение может включать автоматизированное устройство для полуавтоматизированной асептической дезагрегации, обогащения и/или стабилизации клеток и/или клеточных агрегатов из ткани, например, солидной ткани млекопитающего. Автоматизированное устройство для использования с изобретением может включать программируемый процессор и набор для криоконсервации. В некоторых вариантах осуществления набор для криоконсервации может представлять собой одноразовый асептический набор. Изобретение также относится к полуавтоматизированному способу асептической переработки ткани.

В некоторых вариантах осуществления в наборе для сбора могут быть использованы пакеты, такие как пакет для сбора. Пакеты имеют открытый конец, позволяющий добавлять образец, например, образец ткани. В наборе для сбора коннектор может соединять пакет с трубками. Материал трубок может быть запечатываемым и/или свариваемым. Например, трубка может быть запечатана с использованием энергии, такой как тепло, радиочастота и т.д. Материал трубки может быть изготовлен из PVA.

[00666] В некоторых вариантах осуществления трубка может быть соединена с клапаном для позволения добавления одного или нескольких ферментных растворов среды, включая, но без ограничения, коллагеназу, трипсин, липазу, гиалуронидазу, дезоксирибонуклеазу, либеразу НІ, пепсин или их смеси. Например, клапан может представлять собой безыгольный клапан.

Трубка, используемая в наборе для криоконсервации, может включать трубку, имеющую внешний диаметр в диапазоне от примерно 3,0 мм до примерно 5,0 мм с внутренним диаметром трубки в диапазоне от примерно 2,0 мм до примерно 4 мм. В частности, трубка может иметь внешний диаметр $4,1 \pm 0,1$ мм и внутренний диаметр около $3,0 \pm 0,1$ мм. Длина трубки может зависеть от конфигурации набора для сбора.

Например, вариант осуществления набора для сбора может включать трубку длиной от примерно 10 см до примерно 20 см.

В некоторых вариантах осуществления прототип набора для сбора может включать один или несколько зажимов для препятствия и/или предотвращения движения ткани и/или ферментной среды. В частности, можно препятствовать движению ферментной среды и/или ткани в фильтр до стадии фильтрации.

Далее изобретение описано в следующих пронумерованных абзацах:

1. Одноразовый асептический набор, содержащий: модуль дезагрегации для приема и переработки материала, содержащего солидную ткань млекопитающего; дополнительный модуль обогащения для фильтрации дезагрегированного материала солидной ткани и разделения недеагрегированной ткани и фильтрата; и модуль стабилизации для необязательной дополнительной переработки и/или хранения дезагрегированного материала продукта, при этом каждый из указанных модулей содержит один или несколько гибких контейнеров, соединенных одной или несколькими трубками, адаптированными с целью обеспечения движения тканевого материала между ними; и при этом каждый из указанных модулей содержит одно или несколько отверстий для обеспечения возможности асептического ввода среды и/или реагентов в один или несколько гибких контейнеров.

2. Одноразовый асептический набор по п. 1, в котором один или более гибких контейнеров содержат упругий деформируемый материал.

3. Одноразовый асептический набор по п. 1 или 2, в котором один или несколько гибких контейнеров модуля дезагрегации содержат одно или несколько запечатываемых отверстий.

4. Одноразовый асептический набор по п. 3, в котором гибкий контейнер модуля дезагрегации содержит термосвариваемый шов.

5. Одноразовый асептический набор по любому из предыдущих пунктов, в котором один или несколько гибких контейнеров имеют закругленные внутрь края.

6. Одноразовый асептический набор по любому из предшествующих пунктов, в котором один или несколько гибких контейнеров модуля дезагрегации содержат поверхности дезагрегации, адаптированные для механического раздавливания и рассечения в них солидной ткани.

7. Одноразовый асептический набор по любому из предшествующих пунктов, в котором один или несколько гибких контейнеров модуля обогащения

содержат фильтр, который удерживает ретентат целлюляризованной дезагрегированной солидной ткани.

8. Одноразовый асептический набор по любому из предшествующих пунктов, в котором один или несколько гибких контейнеров модуля стабилизации содержат состав среды для хранения жизнеспособных клеток в растворе или в криоконсервированном состоянии.

9. Одноразовый асептический набор по любому из предшествующих пунктов, где набор дополнительно содержит цифровой, электронный или электромагнитный индикатор-метку.

10. Одноразовый асептический набор по п. 9, в котором метка-индикатор относится к конкретной программе, которая определяет: тип процесса дезагрегации и/или обогащения, и/или стабилизации; один или несколько типов среды, используемых в этих процессах; включая дополнительный раствор для замораживания, подходящий для замораживания с регулируемой скоростью.

11. Одноразовый асептический набор по любому предшествующему пункту, в котором один и тот же гибкий контейнер может составлять часть одного или нескольких модулей дезагрегации, модуля стабилизации и необязательных модулей обогащения.

12. Одноразовый асептический набор по любому предшествующему пункту, в котором модуль дезагрегации содержит первый гибкий контейнер для приема ткани, подлежащей переработке.

13. Одноразовый асептический набор по любому предшествующему пункту, в котором модуль дезагрегации содержит второй гибкий контейнер, содержащий среду для дезагрегации.

14. Одноразовый асептический набор по любому предшествующему пункту, в котором необязательный модуль обогащения содержит первый гибкий контейнер и третий гибкий контейнер для приема обогащенного филтраты.

15. Одноразовый асептический набор по любому предшествующему пункту, в котором как модуль дезагрегации, так и модуль стабилизации содержат второй гибкий контейнер, и при этом второй контейнер содержит среду для расщепления и среду для стабилизации.

16. Одноразовый асептический набор по любому предшествующему пункту, в котором модуль стабилизации содержит четвертый гибкий контейнер, содержащий стабилизирующую среду.

17. Одноразовый асептический набор по любому предшествующему пункту, в котором модуль стабилизации также содержит первый гибкий контейнер и/или третий гибкий контейнер для хранения и/или криоконсервации.

18. Применение одноразового асептического набора по любому предшествующему пункту в полуавтоматизированном процессе для асептической дезагрегации, стабилизации и необязательного обогащения клеток или клеточных агрегатов млекопитающих.

19. Автоматизированное устройство для полуавтоматизированной асептической дезагрегации и/или обогащения, и/или стабилизации клеток или клеточных агрегатов из солидной ткани млекопитающих, содержащее: программируемый процессор; и одноразовый асептический набор по любому из пп. 1-17.

20. Автоматизированное устройство по п. 19, дополнительно содержащее считыватель меток радиочастотной идентификации для распознавания одноразового набора.

21. Автоматизированное устройство по п. 19 или 20, в котором программируемый процессор способен распознавать одноразовый асептический набор по метке и впоследствии исполнять программу набора, определяющую тип процессов дезагрегации, обогащения и стабилизации, и соответствующие типы среды, необходимые для этих процессов.

22. Автоматизированное устройство по любому предыдущему пункту, в котором программируемый процессор приспособлен для связи и управления одним или несколькими из: модуля дезагрегации; модуля обогащения; и модуля стабилизации.

23. Автоматизированное устройство по п. 22, в котором программируемый процессор управляет модулем дезагрегации, чтобы обеспечить физическое и/или биологическое разрушение материала солидной ткани.

24. Автоматизированное устройство по п. 23, в котором программируемый процессор управляет модулем дезагрегации, чтобы обеспечить физическое и ферментативное расщепление материала солидной ткани.

25. Автоматизированное устройство по п. 24, в котором ферментативное расщепление материала солидной ткани осуществляется одним или несколькими растворами ферментов среды, выбранными из коллагеназы, трипсина, липазы, гиалуронидазы, дезоксирибонуклеазы, либеразы НІ, пепсина или их смесей.

26. Автоматизированное устройство по любому из пп. 19-25, в котором программируемый процессор управляет поверхностями дезагрегации внутри гибких контейнеров для дезагрегации, которые механически раздавливают и разрезают солидную ткань, при этом поверхности дезагрегации необязательно представляют собой механические поршни.

27. Автоматизированное устройство по любому из пп. 19-25, в котором программируемый процессор управляет модулем стабилизации для криоконсервации обогащенной дезагрегированной солидной ткани в контейнере, необязательно с использованием программируемой температуры.

28. Автоматизированное устройство по любому предшествующему пункту, где устройство дополнительно содержит один или несколько дополнительных компонентов в любой комбинации: датчики, способные распознавать, был ли завершен процесс дезагрегации в модуле дезагрегации перед переносом дезагрегированной солидной ткани в необязательный модуль обогащения; датчики веса для определения количества носителя, необходимого в контейнерах одного или нескольких из модуля дезагрегации; модуля обогащения; и/или модуля стабилизации и управления переносом материала между соответствующими контейнерами; датчики для контроля температуры внутри контейнеров одного или нескольких модулей дезагрегации; модуль обогащения; и/или модуль стабилизации; по меньшей мере один пузырьковый датчик для управления переносом среды между входными и выходными отверстиями каждого контейнера в модуле; по меньшей мере один насос, необязательно перистальтический насос, для управления перемещением среды между входными и выходными отверстиями; датчики давления для оценки давления внутри модуля обогащения; один или несколько клапанов для управления процессом фильтрации с тангенциальным потоком в модуле обогащения; и/или один или несколько зажимов для управления перемещением среды между входными и выходными отверстиями каждого модуля.

29. Автоматизированное устройство по любому предшествующему пункту, в котором программируемый процессор адаптирован для поддержания оптимального диапазона температур хранения в модуле стабилизации до тех пор, пока контейнер не будет удален, или исполняет стадию контролируемого замораживания.

30. Автоматизированное устройство по любому предшествующему пункту, дополнительно содержащее пользовательский интерфейс.

31. Автоматизированное устройство по п. 23, в котором интерфейс содержит экран дисплея для отображения инструкций, которые направляют пользователя для ввода параметров, подтверждения предварительно запрограммированных стадий, предупреждения об ошибках или их комбинации.

32. Автоматизированное устройство по любому предшествующему пункту, в котором автоматизированное устройство адаптировано для транспортировки.

33. Способ полуавтоматизированной асептической переработки ткани, включающий: автоматизированное определение стадий асептической дезагрегации ткани и связанных с ними состояний по цифровому, электронному или электромагнитному индикатору-метке, связанному с набором для асептической обработки, необязательно в соответствии с набором по любому из пп. 1-17; помещение образца ткани в гибкий пластиковый контейнер модуля дезагрегации набора для асептической обработки; и переработку образца ткани путем автоматизированного исполнения одной или нескольких стадий обработки ткани посредством коммуникации с модулем дезагрегации; дополнительным модулем обогащения; и модулем стабилизации, и управления ими.

Методики сбора опухолевого материала, криоконсервации и изготовления ТП

Исходный материал для изготовления ТП представляет собой дезагрегированную и криоконсервированную клеточную суспензию, содержащую аутологичные ТП и опухолевые клетки от подходящего пациента. Представлена иллюстративная блок-схема (фиг. 65) сбора и переработки исходного материала опухоли.

Опухоль хирургически резецируют, а затем обрезают для удаления видимой некротической ткани, визуальнo здоровой (не раковой) ткани, жировой ткани и избытка крови. Масса обрезанной опухоли должна быть больше или равна 2 граммам (≥ 2 граммам). Опухоли массой более 7 г могут быть разделены на более мелкие части и дезагрегированы по отдельности.

Каждый фрагмент опухоли помещают в индивидуальный стерильный пакет, содержащий среду, коллагеназу и ДНКазу. Примеры реагентов показаны в следующей таблице:

Таблица 4 – Среда для дезагрегации			
Сырьевой материал	Получено от животного/человека	Поставщик	Имеющиеся сертификаты
Фосфатно-солевой	Нет	Life Technologies Ltd	CoA

буферный раствор			
2 mM Хлорид кальция	Нет	Sigma-Aldrich	CoA
ДНКаза 1 (Дорназа альфа)	Одобренный медицинский продукт в США	Roche Products Ltd	CoA
Коллагеназа тип IV	Бычий	Nordmark Arzneimittel GmbH & Co KG	CoA, CoO, TSE/BSE statement
BloodStor 55-5 (55% DMSO)	Нет	BioLife Solutions	CoA

Затем пакет герметизировали термосваркой и его содержимое дезагрегировали с получением гомогенной клеточной суспензии, содержащей опухоль и ТП. Дезагрегацию осуществляли с помощью устройства, такого как описанное в настоящем документе устройство Tiss-U-Stor, которое запускает программу, обеспечивающую определенное количество повторных событий физического сжатия с определенным давлением сжатия в течение определенного времени, чтобы обеспечить доступ фермента в ткань опухоли, тем самым ускоряя ферментативное расщепление. Количество циклов, давление, температура и продолжительность записывали для каждой отдельной опухоли.

Гомогенизированную клеточную суспензию затем асептически фильтровали с использованием 200-мкм фильтра (Baxter, RMC2159) и фильтрат асептически переносили в пакет для криоконсервации. BloodStor 55-5 (Biolife Solutions, Bothell, WA) добавляли в асептических условиях для достижения 5% DMSO. Затем клеточную суспензию подвергают криоконсервации с использованием устройства Tiss-U-Stor с определенной программой охлаждения, и регистрировали измеренный температурный профиль для каждой отдельной клеточной суспензии, полученной из каждой части опухоли. Криоконсервированную клеточную суспензию хранили в паровой фазе жидкого азота.

Рекомендуемые условия хранения криоконсервированной суспензии клеток: $\leq -130^{\circ}\text{C}$.

Суспензия клеток транспортировали из клинического учреждения на предприятие по производству препаратов клеточной терапии GMP квалифицированной курьерской службой, упакованной в контейнер, утвержденный для обеспечения поддержания криоконсервированной клеточной суспензии при температуре $\leq -130^{\circ}\text{C}$.

(Tiss-u-Stor)

Резецированные опухоли оценивали в отношении массы и состояния. Для каждого фрагмента опухоли удаляли посторонний материал и фрагмент взвешивали. Пакет CS50N открывали, добавляли примерно до 7 г опухоли, и затем пакет запечатывали. В пакет с 2 мкл гентамицина/амфотерицина на мл EDM добавляли 15 мл среды для расщепления EDM с помощью шприца через безыгольный порт с последующим удалением воздуха из пакета в шприц.

Опухолевую ткань и среду для дезагрегации в пакете для дезагрегации помещали в дезагрегатор ткани с регулируемой температурой. Температуру повышали от температуры окружающей среды до 35°C со скоростью 1,5°C/мин и поддерживали на уровне 35°C в течение примерно 45 минут, в течение которых дезагрегатор работал со скоростью 240 циклов в минуту.

После дезагрегации опухолевой материал фильтровали через встроенный фильтр во вторичный мешок для замораживания. Через безыгольный порт вводили 1,5 мл Blood stor (DMSO) и удаляли воздух.

Для тестирования отбирали 2 мл суспензии.

Для необязательной криоконсервации криопакет загружали в морозильную кассету, и морозильную кассету помещали в морозильную камеру Via Freeze. Затем Via Freeze охлаждали до -80°C, предпочтительно непосредственно от 35°C до -80°C со скоростью -2°C/мин.

Затем замороженный криопакет переносили в хранилище с жидким азотом.

Производство TIL

Аутологичная ткань, используемая для культивирования в Соединенном Королевстве (Великобритания), должна соответствовать HTA-GD-20, Guide to Quality and Safety Assurance for Human Tissue and Cells for Patient Treatment, установленному UK's Human Tissue Authority with suitable consent, Chain of Identity, Chain of Custody and screening to confirm donors are negative for Hepatitis B virus, Hepatitis C virus, HIV-1 & 2, HTLV-1 & 2, and Syphilis.

Производство включает выращивание и размножение криоконсервированной клеточной суспензии, содержащей TIL и опухолевые клетки, полученные из резецированной опухоли. Если опухоль больше примерно 7 г, в процессе резекции создается несколько криоконсервированных клеточных суспензий, где каждая клеточная суспензия происходит из фрагмента опухоли весом 2–7 г. Как правило, для выращивания 1 TIL необходимо разморозить только одну клеточную суспензию, в то время как остальные криоконсервированные клеточные суспензии остаются под

контролем GMP и хранятся в рекомендуемых условиях хранения (паровая фаза жидкого азота).

В некоторых вариантах осуществления клеточную суспензию фильтровали после дезагрегации перед криоконсервацией. Иллюстративная методика производства показана на фиг. 66. Иллюстративные производственные сырьевые материалы представлены в следующей таблице:

Таблица 5 – Источник сырьевых материалов			
Сырьевой материал	Получен от человека/животного	Поставщик	Имеющиеся сертификаты
Т-клеточная среда	Человек и животное	ThermoFisher Scientific	CoA, CoO
Фетальная бычья сыворотка (FBS)	Животное	Life Technologies	CoA, CoO
Гентамицин / Амфотерицин В, 500x	Нет	Life Technologies	CoA
IL-2 (алдеслейкин)	Нет данных	Clinigen	CoA
Человеческая сыворотка АВ	Человек	Valley Biomedical	CoA with Origin
MACS GMP CD3 ОКТ3 антитело	Нет	Miltenyi Biotec	CoA
Облученная лейкоцитарная пленка	Человек	SNBTS	CoA
Фосфатно-солевой буферный раствор	Нет	Life Technologies	CoA
Альбумин (человеческий) 20%	Человек	OctaPharma	CoA with Origin
CryoSure-DMSO	Нет	WAK – Chemie Medical GmbH	CoA, TSE

Т-клеточная среда (TCM) содержит альбумин (человеческий), человеческий голотрансферрин и холестерин животного происхождения. Исходную плазму, используемую для производства альбумина и трансферрина, получали из США, и доноров проверяли на наличие посторонних агентов.

Холестерин получали из овечьего шерстяного жира, происходящего из Австралии/Новой Зеландии, что соответствует правилам Министерства сельского хозяйства США, запрещающим исходный материал жвачных животных из стран, где зарегистрированы случаи передачи губчатой энцефалопатии (TSE).

Фетальную бычью сыворотку (FBS) получали из Австралии/Новой Зеландии в соответствии с правилами Министерства сельского хозяйства США, запрещающими

исходный материал жвачных животных из стран, где зарегистрированы случаи передачи губчатой энцефалопатии (TSE). FBS тестировали в соответствии с 21 CFR часть 113.47, в частности, включая: вирус блутанга, аденовирус крупного рогатого скота, парвовирус крупного рогатого скота, респираторно-синцитиальный вирус крупного рогатого скота, вирус вирусной диареи крупного рогатого скота, вирус бешенства, реовирус, цитопатические агенты, гемадсорбирующие агенты. FBS инактивировали нагреванием при 56°C в течение 30 минут и трижды фильтровали через фильтр 0,1 мкм с получением двух ортогональных стадий удаления вирусов.

Человеческую сыворотку АВ получали от Valley Biomedical, зарегистрированного FDA предприятия (1121958). Каждую донорскую единицу тестировали на наличие поверхностного антигена вируса гепатита В (HBsAg), вирус гепатита В (HBV), тест амплификации нуклеиновых кислот (NAT), антитела к вирусу иммунодефицита человека (HIV) 1 и 2 типов, HIV-1 NAT, антитела к вирусу гепатита С (HCV), HCV NAT и тест на сифилис методами, одобренными FDA. Сыворотку инактивировали нагреванием при 56°C в течение 30 минут и фильтровали через фильтр 0,1 мкм.

Источник облученной лейкоцитарной пленки, подготовка, отгрузка и хранение: Шотландская национальная служба переливания крови (The Scottish National Blood Transfusion Service, SNBTS) проверяет доноров, собирает компонент крови, осуществляет подготовку и облучает лейкоцитарную пленку. SNBTS имеет лицензию United Kingdom's Human Tissue Authority (номер лицензии 11018) в соответствии с положениями Blood, Safety and Quality Regulations (2005) на закупку, обработку, тестирование, хранение и распространение крови, компонентов крови и тканей.

Скрининг здоровых доноров соответствует или превосходит требования, описанные в Своде федеральных правил США (CFR), раздел 21, часть 1271.75, за исключением того, что доноры проживают в Соединенном Королевстве. Хотя это представляет теоретический риск спорадической болезни Крейтцфельдта-Якоба (sCJD) или варианта болезни Крейтцфельдта-Якоба (vCJD), в Соединенном Королевстве существует надежная национальная программа эпиднадзора. Самый последний ежегодный отчет, охватывающий период с мая 1990 г. по 31 декабря 2018 г. (National CJD Research & Surveillance Unit, 2018), подтверждает, что заболеваемость sCJD в Великобритании сравнима с заболеваемостью, наблюдаемой в других странах мира, включая страны, свободные от губчатой энцефалопатии крупного рогатого скота (BSE). С 2017 г. по 5 апреля 2020 г. не было зарегистрировано ни одного случая vCJD,

а с 1 января 2012 г. в стране было выявлено только два случая (NCJDRSU Monthly Report, 2020). Эта сеть строгого эпиднадзора позволила ликвидировать инфекции, передающиеся при переливании крови, и с 2007 г. не было зарегистрировано ни одного случая (National CJD Research & Surveillance Unit, 2018) Иллюстративное тестирование подходящего донора (таблица 7) соответствует требованиям 21 CFR часть 1271.85 и добавлено тестирование на гепатит Е, которое не требуется.

Таблица 6 – Иллюстративный скрининг донора (NHSBT)		
Патоген	Спецификация	Требование
Гепатит В, С & Е вирус	Не обнаружено/Негативный	Каждое донорство
Вирус иммунодефицита человека (HIV) тип 1 и 2	Не обнаружено/Негативный	Каждое донорство
Сифилис	Не обнаружено/Негативный	Каждое донорство
Человеческий Т-клеточный лимфотрофический вирус (HTLV) тип 1 и 2	Не обнаружено/Негативный	1 st донорство и в выбранные последующие донорства
Малярия	Не обнаружено/Негативный	Тест проводился в зависимости от индивидуальных обстоятельств донора
<i>T. cruzi</i>	Не обнаружено/Негативный или IgG позитивный	
Вирус Западного Нила	Не обнаружено/Негативный	
Цитомегаловирус (CMV)	Не обнаружено/Негативный или IgG позитивный	

Лицензированное учреждение крови готовило облученные лейкоцитарные пленки клинического качества, которые подходят для лечения пациентов с тяжелой нейтропенией. Для получения лейкоцитарной пленки кровь центрифугировали, чтобы сформировать три слоя: слой эритроцитов, слой лейкоцитарной пленки и слой плазмы. Лейкоцитарные пленки от 10 доноров облучали дозой от 25 до 50 Гр для остановки роста клеток. Облученные лейкоцитарные пленки клинической чистоты изготавливали и отправляли на производственное предприятие GMP ночной курьерской службой с использованием транспортера с контролируемой температурой, включающего датчик температуры. Отгрузка происходила за день до использования в производственном процессе.

После получения лейкоцитарные пленки выдерживали при температуре 15-30°C до использования в производстве.

Получение облученных питающих клеток

Лейкоцитарные пленки от десяти уникальных доноров объединяли, затем центрифугировали в градиенте плотности Ficoll для сбора мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC). Приблизительно 4×10^9 жизнеспособных лейкоцитов ресуспендировали в TCM с добавлением примерно 8% человеческой сыворотки АВ, 3000 МЕ/мл IL-2 и 30 нг ОКТ-3 в закрытом статическом пакете для культивирования клеток. PBMC получали в соответствии со спецификацией.

Таблица 7 – Спецификация стока аллогенных PBMC		
Параметры	Способ тестирования	Критерии приемлемости
Внешний вид	Визуальная оценка	ID label
Идентичность	Проточная цитометрия	$\geq 85\%$ жизнеспособных CD45+ клеток
Жизнеспособность	Проточная цитометрия	Результаты отчета
Общее содержание жизнеспособных лейкоцитов	Проточная цитометрия	$2 - 4 \times 10^9$

PBMC также тестировали на стерильность и микоплазму. Непосредственно перед началом стадии 3 (день 12, фиг. С) образец составленной питающей клетки, включая среду, IL-2 и ОКТ3, удаляли. Этот образец инкубировали и анализировали на дни 13, 17 и 18, чтобы подтвердить, что питающие клетки не размножаются.

Альбумин (человеческий), также известный как сывороточный альбумин человека (HSA), получали от доноров из США. Все доноры плазмы проходили индивидуальное тестирование и получили отрицательный результат на HBsAg, анти-HIV 1, анти-HIV 2 и анти-HCV антитела. Каждый пул плазмы тестировали и получили отрицательный результат на HBsAg, анти-HIV 2 и HCV-RNA по NAT. Продукт HSA получали в соответствии с правилами GMP, выполняя критерии производства и испытаний Фармакопеи США и Европы.

Выращивание TIL

Суспензию клеток засеивали приблизительно от $0,25 \times 10^6$ до $0,75 \times 10^6$ жизнеспособных клеток/мл в TCM с добавлением 10% FBS, 0,25 мкг/мл амфотерицина В с 10 мкг/мл гентамицина (Life Technologies, Grand Island, NY), и интерлейкина-2 (IL-2; альдеслейкин) 3000 МЕ/мл (Clinigen, Nürnberg, Germany), и культивировали в стандартных условиях культивирования клеток (37°C , 5% CO_2).

На 5-й день половину среды удаляли и заменяли TCM с добавлением 10% FBS, 0,50 мкг/мл амфотерицина В, 20 мкг/мл гентамицина и 6000 МЕ/мл IL-2.

На 7-й день, если концентрация клеток составляет $> 1,5 \times 10^6$ жизнеспособных клеток/мл, культуру для выращивания ТИЛ разбавляли трехкратным объемом для поддержания приблизительно от $0,1 \times 10^6$ до $2,0 \times 10^6$ жизнеспособных клеток/мл. Если концентрация клеток составляет $\leq 1,5 \times 10^6$ жизнеспособных клеток/мл, заменяют половину среды. В любом варианте среда представляет собой ТСМ с добавлением 10% FBS, 0,50 мкг/мл амфотерицина В, 20 мкг/мл гентамицина и 6000 МЕ/мл ИЛ-2.

На 10-й день, если концентрация клеток составляет $> 1,5 \times 10^6$ жизнеспособных клеток/мл, культуру для выращивания ТИЛ разбавляли трехкратным объемом для поддержания приблизительно от $0,1 \times 10^6$ до $2,0 \times 10^6$ жизнеспособных клеток/мл. Если концентрация клеток составляет $\leq 1,5 \times 10^6$ жизнеспособных клеток/мл, заменяют половину среды. В любом варианте добавляют среду ТСМ с добавлением 10% FBS, 0,50 мкг/мл амфотерицина В, 20 мкг/мл гентамицина и 6000 МЕ/мл ИЛ-2.

Активация ТИЛ

ТИЛ активировали с использованием анти-CD3 антитела (ОКТ3) для обеспечения специфической стимуляции CD3 при связывании с рецептором FC облученных питающих клеток из аллогенных мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC). Питающие клетки обеспечивают естественный источник дополнительной костимуляции для поддержки добавленного анти-CD3 (ОКТ-3).

На 12-й день от 1 до 20×10^6 жизнеспособных Т-клеток в результате выращивания ТИЛ на стадии 2 добавляли к $2,0-4,0 \times 10^9$ жизнеспособных облученных питающих клеток (раздел 8.1.4.4) с использованием приблизительно 30 ± 10 нг/мл ОКТ3, приблизительно 8% человеческой сыворотки АВ и 3000 ± 1000 МЕ/мл ИЛ-2. Культуру для активации ТИЛ инкубировали в течение 6 дней в стандартных условиях культивирования клеток.

Размножение ТИЛ

На 18-й день активированные ТИЛ продолжали размножать путем асептического добавления суспензии активированных клеток ТИЛ в биореактор, содержащий Т-клеточную среду с добавлением примерно 8% человеческой сыворотки АВ и 3000 МЕ/мл ИЛ-2.

На 19-й день для размножения ТИЛ обеспечивали непрерывную подачу Т-клеточной среды с добавлением 3000 МЕ/мл ИЛ-2 до сбора.

ТИЛ собирали путем промывания клеток с использованием SEFIATM. Клетки концентрировали путем центрифугирования, затем промывали 2-4 раза с использованием фосфатно-солевого буферного раствора (PBS) с добавлением 1%

альбумина сыворотки человека (HSA). Затем клетки ресуспендировали в PBS + 1% HSA примерно до 50-60 мл.

Промытые и концентрированные клетки в асептических условиях переносили в криопакет и часть удаляли для тестирования партии и сохраняли образцы. Криопротектор добавляли с получения готового продукта с $\geq 5 \times 10^9$ жизнеспособных клеток, суспендированных примерно в 10% DMSO и 8,5% HSA в PBS. Часть удаляли для тестирования партии и сохранения образцов. Криопакет охлаждали до -80°C .

Процессы производства TIL

В следующей таблице показаны примеры вариантов процесса.

Варианты процесса	v1.0	v1.1	v1.2	ITIL-168
Дезагрегация опухоли	Дезагрегация вручную	Дезагрегация вручную	Tiss-U-Stor дезагрегация	Tiss-U-Stor дезагрегация
Исходный материал	Свежий	Криоконсерв	Криоконсерв	Криоконсерв
TIL Выращивание	1-3 недели	1-3 недели	12 дней	12 дней
Стадия промежуточной выдержки	Криоконсерв	Криоконсерв	Нет данных	Нет данных
Извлечение TIL	3 дня	3 дня	Нет данных	Нет данных
Фаза быстрого размножения	12 дней	12 дней	12 дней	12 дней
Распространение культуры	0 - 2 дня	0 - 2 дня	Нет данных	Нет данных
Конечный продукт	Свежий	Свежий	Криоконсерв	Криоконсерв

В следующей таблице показаны данные по лекарственному продукту

Партия продукта	Версия процесса	Выход ($\times 10^{10}$)	Жизнеспособность	Процент CD3+ клеток
TIL001	1.0	1.1	82	N/A
TIL003	1.0	2.2	94	98
TIL005	1.0	2.0	96	N/A
TIL012	1.0	3.2	95	98
TIL013	1.0	2.1	80	92
TIL014	1.0	4.4	91	95

TIL015	1.0	6.4	91	97
TIL016	1.0	5.5	93	96
TIL027	1.0	3.8	95	97
TIL032	1.0	3.7	92	99
TIL035	1.0	6.4	96	90
TIL037	1.0	2.6	92	97
TIL038	1.0	1.3	83	98
TIL039	1.1	1.2	80	93
TIL040	1.0	5.3	93	97
TIL041	1.0	3.2	93	98
TIL043	1.0	4.8	93	98
TIL054	1.1	0.82	86	91
TIL065	1.1	3.4	94	97
TIL067	1.2	3.0	91	97
TIL073	1.0	5.4	92	98
TIL077	1.2	1.0	91	97
TIL078	1.2	3.4	99	98
E2	1.2	3.5	86	97
E3	1.2	1.8	80	96
E4	1.2	1.0	88	93
E5	1.2	4.1	98	100

При сравнении криоконсервированных и свежих клеточных суспензий репрезентативные выходы были постоянными, что продемонстрировано сходным выходом лекарственного вещества (ФИГ. 67А), жизнеспособностью (ФИГ. 67В) и процентом Т-клеток (ФИГ. 67С).

Оптимизация криоконсервации. В качестве заменителя опухолевого материала изолированные РВМС расщепляли с использованием процесса и материалов Tiss-U-Stor. Коммерческие агенты для криоконсервации (CPA) оценивали в различных условиях для определения, какой реагент обеспечивает максимальную жизнеспособность после оттаивания (ФИГ. 68). Жизнеспособность после оттаивания двух CPA, Cryostor10 и Stem Cell Banker, не содержащих DMSO, была одинаковой. Затем CryoStor на основе DMSO сравнили с Bloodstor 55-5, криоконсервантом на основе DMSO, и был выбран продукт BloodStor с более высокой концентрацией,

поскольку он был более концентрированным, что позволяло использовать криopakет меньшего размера. Затем сравнивали криоконсервацию в соответствии с протоколом, в котором либо выдерживал материал при 4°C в течение 10 минут, затем снижал температуру со скоростью -1°C/мин, либо снижал температуру с 35°C до -80°C напрямую со скоростью -2°C/мин. Жизнеспособность после оттаивания была одинаковой для двух использованных протоколов криоконсервации (фиг. 69).

Во время охлаждения при образовании центров кристаллизации льда выделяется теплота. Переохлаждение, явление, при котором выделяющееся тепло нагревает раствор, связано с более низким восстановлением после оттаивания. Данные о температуре регистрировали для тестируемых препаратов во время криоконсервации с использованием обоих протоколов (фиг. 70). Переохлаждение наблюдалось в обоих независимых циклах с использованием протокола -1°C/мин, тогда как протокол охлаждения -2°C/мин не зафиксировал ни одного события переохлаждения в первом цикле, а во втором независимом цикле наблюдалось событие переохлаждения с выделением меньшего количества тепла по сравнению с альтернативным протоколом (фиг. 70).

Криоконсервированный DP переносили в паровую фазу LN2 для хранения и транспортировки при $\leq -130^\circ\text{C}$.

Тестировали стерильность образцов, и сохраненные образцы замораживали с использованием Coolcell® (Biocision, Larkspur, CA) при -80°C, затем переносили в паровую фазу LN2 для целей хранения.

Несмотря на то, что настоящее изобретение и его преимущества были подробно описаны, следует понимать, что в нем могут быть сделаны различные изменения, замены и модификации без отклонения от сущности и объема изобретения, как определено в прилагаемой формуле изобретения.

Несмотря на то, что настоящее изобретение и его преимущества были подробно описаны, следует понимать, что в нем могут быть сделаны различные изменения, замены и модификации без отступления от сущности и объема изобретения, как определено в прилагаемой формуле изобретения.

Настоящее изобретение будет дополнительно проиллюстрировано в следующих примерах, которые приведены только в иллюстративных целях и никоим образом не предназначены для ограничения изобретения.

Примеры

Пример 1

На ФИГ. 39 показан вариант осуществления пакета 400 во время использования. Как показано, пакет 400 закреплен с помощью фиксирующего элемента, такого как зажим 402, внутри устройства 404, такого как лоток 406. Ткань 408 видна через прозрачную сторону пакета 400. Трубка 410 соединена с пакетом 400.

Пример 2

На ФИГ. 40 показан вариант осуществления пакета 420 для использования в изобретении, как описано в настоящем документе. Как показано, пакет 420 закреплен защитным элементом 422 на устройстве и лотке 424. Тканевый материал 424 виден через прозрачную сторону пакета 420. Трубка 426 соединена с пакетом 420. Как показано, положение пакета 400 внутри лотка 406 дополнительно закрепляется с помощью фиксирующего элемента 428, в частности, ленты. Ткань 424 видна через прозрачную сторону пакета 420. Как показано на ФИГ. 40, пакет может включать отверстия 430 для доступа внутрь пакета и/или ткани 424.

Пример 3 - Дезагрегация и криоконсервация

TIL075 изготавливали из кусочков (образцов) метастатической опухоли меланомы. Образцы опухолей взвешивали и обрабатывали следующим образом. S1 = 1,4 г. S1 дезагрегировали с помощью автоматизированной процедуры. S2 = 19,4 г. S2 разделяли, одну часть (около 7,7 г) дезагрегировали с помощью автоматизированной процедуры, а вторую часть (около 12 г) дезагрегировали вручную.

Ручная дезагрегация: Образец опухоли разрезали на более мелкие кусочки размером 2-4 мм³ и добавляли во флакон, содержащий 80 мл среды для расщепления с антибиотиками. Флакон помещали на шейкер и дезагрегировали в течение ночи (около 14 часов) при 37°C. Затем гидролизат фильтровали через сетчатые ячейки и фильтры для клеток 100 мкм в пробирки Falcon 50. 10% отфильтрованного гидролизата откладывали в сторону для проверки на стерильность. Остаток центрифугировали и ресуспендировали в 12 мл CS10 и разделяли на 12 криопробирок.

Дезагрегация Tiss-U-Stor: два пакета CS50N открывали стерильными ножницами, отрезая конец без отверстий. Образец S1 массой 1,4 г и порцию S2 массой 7,7 г помещали в пакеты CS50N и пакеты запечатывали. 15 мл дезагрегационной среды и 30 мкл антибиотиков объединяли и добавляли в каждый запечатанный пакет с помощью шприца через безыгольные порты пакетов. Пакеты переносили в дезагрегатор тканей, загруженный в ViaFreeze, и запускали протокол дезагрегации. Протокол дезагрегации предусматривал повышение температуры от комнатной со

скоростью 1,5°C/мин до 35°C и поддержание температуры на уровне 35°C, пока дезагрегатор был активен. Скорость дезагрегатора была установлена на уровне 240 циклов/мин. После этого температура ViaFreeze оставалась равной 35°C до стадии криоконсервации.

Установка пакета включает прямое соединение с помощью трубки через встроенный фильтр со вторичным криопакетом. Дезагрегированный материал в пакете CS50 фильтровали в криопакет и герметизировали трубное соединение. 1,5 мл Blood-stor (DMSO) медленно добавляли через безыгольное отверстие криопакета, пакет помещали в кассету, предназначенную для оптимальной теплопередачи, и кассету снова помещали в ViaFreeze вместо дезагрегатора.

Был задействован протокол криоконсервации после дезагрегации. Цикл замораживания повышал температуру ViaFreeze с 35°C при -2°C в минуту до -80°C. Замороженные пакеты переносили в хранилище с жидким азотом.

Пример 4 - Дезагрегация и криоконсервация

TIL077 изготавливали из кусочков (образцов) метастатической опухоли меланомы. Образцы опухолей взвешивали и обрабатывали следующим образом. S1 = 4,6 г. S2 = 4,6 г.

Дезагрегация Tiss-U-Stor: два пакета CS50N открывали стерильными ножницами, обрезая конец без отверстий. Образец S1 = 4,6 г и образец S2 = 4,6 г помещали в пакеты CS50N и пакеты запечатывали. 15 мл дезагрегационной среды и 30 мкл антибиотиков объединяли и добавляли в каждый запечатанный пакет с помощью шприца через безыгольные порты пакетов. Пакеты переносили в дезагрегатор тканей, загруженный в ViaFreeze, и запускали протокол дезагрегации. Протокол дезагрегации предусматривал повышение температуры от комнатной со скоростью 1,5°C/мин до 35°C и поддержание температуры на уровне 35°C, пока дезагрегатор был активен. Скорость дезагрегатора была установлена на уровне 240 циклов/мин. После этого температура ViaFreeze оставалась равной 35°C до стадии криоконсервации. На фиг. 71 показаны записи по дезагрегации.

Установка пакета включает прямое соединение с помощью трубки через встроенный фильтр со вторичным криопакетом. Дезагрегированный материал в пакете CS50 фильтровали в криопакет и запечатывали трубное соединение. 1,5 мл Blood-stor (DMSO) медленно добавляли через безыгольное отверстие криопакета, пакет

помещали в кассету, предназначенную для оптимальной теплопередачи, и кассету снова помещали в ViaFreeze вместо дезагрегатора.

Был задействован протокол криоконсервации после дезагрегации. Цикл замораживания повышал температуру ViaFreeze с 35°C при -2°C в минуту до -80°C. На фиг. 71 показаны записи по криоконсервации. Замороженные пакеты переносили в хранилище с жидким азотом.

Пример 5 - Дезагрегация и криоконсервация

TPL078 изготавливали из кусочков (образцов) метастатической опухоли меланомы. Образцы опухолей взвешивали и обрабатывали следующим образом. S1 = 11 г. S2 = 2 г.

Дезагрегация Tiss-U-Stor: два пакета CS50N открывали стерильными ножницами, отрезая конец без отверстий. Опухолевой материал разделяли и 6,4 г образца помещали в каждый из двух пакетов CS50N и пакеты запечатывали. 15 мл дезагрегационной среды и 30 мкл антибиотиков объединяли и добавляли в каждый запечатанный пакет с помощью шприца через безыгольные порты пакетов. Пакеты переносили в дезагрегатор тканей, загруженный в ViaFreeze, и запускали протокол дезагрегации. Протокол дезагрегации предусматривал повышение температуры от комнатной со скоростью 1,5°C/мин до 35°C и поддержание температуры на уровне 35°C, пока дезагрегатор был активен. Скорость дезагрегатора была установлена на уровне 240 циклов/мин. После этого температура ViaFreeze оставалась равной 35°C до стадии криоконсервации. На фиг. 72 показаны записи по криоконсервации.

Установка пакета включает прямое соединение с помощью трубки через встроенный фильтр со вторичным криопакетом. Дезагрегированный материал в пакете CS50 фильтровали в криопакет и запечатывали трубное соединение. 1,5 мл Blood-stor (DMSO) медленно добавляли через безыгольное отверстие криопакета, пакет помещали в кассету, предназначенную для оптимальной теплопередачи, и кассету снова помещали в ViaFreeze вместо дезагрегатора.

Был задействован протокол криоконсервации после дезагрегации. Цикл замораживания повышал температуру ViaFreeze с 35°C при -2°C в минуту до -80°C. На фиг. 72 показаны записи по криоконсервации. Замороженные пакеты переносили в хранилище с жидким азотом.

Пример 6 - Дезагрегация и криоконсервация

TIL081 изготавливали из кусочков (образцов) метастатической опухоли меланомы. Программное обеспечение было обновлено, чтобы включить дезагрегацию и криоконсервацию в единый протокол. На фиг. 73 показаны записи подезагрегации и криоконсервации. Как и в предыдущих примерах, дезагрегатор был активен примерно 53 мин. (фиг. 73А, 73В). Дезагрегированную ткань переносили из пакета для дезагрегации через фильтр в криопакет и возвращали в ViaFreeze для криоконсервации в течение примерно 90 мин от начала процесса дезагрегации, когда было инициировано криогенное охлаждение.

Пример 7 - Производство из флаконов

Таблица 9 – Криоконсервация и оттаивание клеток		
Реагенты/Материалы		
Реагент	Производитель	Номер по каталогу
Среда в зависимости от типа клеток	Нет данных	Нет данных
DPBS	Sigma	D8537-500ML
15 мл Центрифужная пробирка	VWR	339650
Пипетка 10 мл	Corning	CLS4101
Пипетка 25 мл	Corning	CLS4251
Пипетка 5 мл	Corning	CLS4051
Наконечники 1000 мкл с фильтром	StarLabs	S1182-1730
Трипановый синий	Sigma	T8154-100ML

Таблица 10 - Оборудование			
Описание	Производитель	Номер детали	Серийный номер/Инвентарный номер
Powerpette pro 1-100 мл	VWR	452-8344	Нет данных
Pipette ErgoOne 100-1000 мкл	Star Labs	S7110-1000	Нет данных
Megafuge 40R центрифуга	Hereus	75004518	41536283
Гемацитометр	Hawksley	HC002	Нет данных
Водяная баня 12л	VWR	462-0557	BP1912001
IncuSafe CO ₂ инкубатора	PHCBI	MCO-170AIC-PE	Нет данных

Криопробирки извлекали из жидкого азота и помещали в водяную баню при 37°C до тех пор, пока клеточная суспензия не расплавится. Суспензию клеток помещали в 15-мл сосуд Falcon, добавляли PBS до 10 мл и центрифугировали при 400g в течение 10 минут. Супернатант декантировали.

Для культивирования клеток клеточный осадки ресуспендировали в предварительно нагретой среде, первоначально в небольшом объеме, т.е. от 2 до 3 мл. Адгезивные клеточные линии (т.е. опухолевые линии, НЕК 293) добавляли в колбы с тканями со средой в соответствии со следующей таблицей. Неадгезивные клеточные линии (т.е. Т-клетки, ТП, клетки Jurkat) высевали при плотности от 0,5 до 1×10^6 клеток на мл. Колбы помещали во влажный инкубатор с температурой 37°C и меняли среду каждые 2-3 дня.

Таблица 11 – Плотности высевания клеток для адгезивных клеток в разных сосудах		
Тип сосуда/колбы	Плотность высевания	Объем среды, мл
24 луночный	0.1×10^6	0.5 to 1
6 луночный	0.5×10^6	2 to 4
T 25	0.7×10^6	4 to 6
T 75	2.1×10^6	12 to 15
T 150	4.4×10^6	25 to 30

Пример 8 - Изготовление из криоконсервированных дезагрегированных опухолей

Процесс изготовления

Размораживание исходных материалов

Систему оттаивания VAThaw CB1000 использовали для управления нагревом криоконсервированных образцов, хранящихся в криопакетах. Криоконсервированную клеточную суспензию оттаивали, затем разводили в Т-клеточной среде (TCM) производства Life Technologies (Paisley, United Kingdom). TCM содержит 80% среды Rosewll Park Memorial Institute (RPMI) 1640 и 20% AIM V. Суспензию клеток фильтровали через фильтр 70-100 мкм и центрифугировали, а надосадочную жидкость удаляли. Осадок клеток ресуспендировали в TCM с добавлением 10% облученной фетальной бычьей сыворотки (FBS) (Life Technologies, Auckland, New Zealand).

Дезагрегированную криоконсервированную опухоль (около 16,5 мл) в пакете Origin CS50 помещали в лоток для оттаивания системы оттаивания VIAThaw CB1000 и нагревали примерно до 0°C.

Пример 9 - Активность

В способе оценки активности на основе совместного культивирования количественно определяли процент Т-клеток, активированных линией клеток-мишеней, экспрессирующей ОКТ3. Механизм действия продукта ТПЛ *in vivo* включает презентацию пептида ТПЛ через рМНС-HLA, который связывается с TCR *in vivo*. В анализе активности количественно оценивают процентную долю активных Т-клеток как количество жизнеспособных Т-клеток, положительных по CD137, IFN- γ , TNF α или CD107a, деленое на общее количество жизнеспособных Т-клеток при специфической активации путем совместного культивирования с клеточной линией K562, экспрессирующей антигенсвязывающий домен ОКТ3. Маркеры, используемые для количественной оценки активности Т-клеток, включают DRAQ7, CD45, CD2, CD107a, CD137, TNF- α и IFN- γ .

Для измерения активности клетки ITIL-168 DS совместно культивировали в течение примерно 5 часов с использованием 1 из 3 клеточных линий: Условие 1 - Отсутствие стимуляции - фоновая клеточная активность; Условие 2 - клеточная линия K562 - фоновая TCR-независимая реактивность; Условие 3 - клеточная линия K562, экспрессирующая ScFv против ОКТ-3 - TCR-индуцированная стимуляция Т-клеток.

Культивированные клетки анализировали с помощью проточной цитометрии и гейтировали жизнеспособные лейкоциты для количественного определения Т-клеток, которые экспрессируют по меньшей мере 1 из 4 маркеров активации. Для испытаний на стабильность криоконсервированные клетки DP размораживали, промывали и оставляют на ночь.

Активность ITIL-168 TCR рассчитывали следующим образом: стадия 1) % активности вследствие неспецифической стимуляции получали из условия 2; стадия 2) % активности за счет специфической и неспецифической стимуляции CD3 получали из условия 3; стадия 3) % активности за счет специфической стимуляции CD3 рассчитывали как условие 3 – условие 2.

Как для условия 2, так и для условия 3, результат % активности составляет 100% минус процент всех Т-клеток, которые являются CD137-/IFN- γ -/TNF α -/CD107a- (т.е. фон). Эта популяция не продуцирует по меньшей мере один маркер.

Пример 10 - Выращивание ТПЛ и быстрое расширение

Процесс производства ТПЛ начинается после резекции опухоли, дезагрегации, криоконсервации и необязательной упаковки и отправки, упаковки при отправке и

отправки из Центра обработки опухолей на производственное предприятие Instil квалифицированным грузоотправителем в контролируемых условиях. Криоконсервированную опухоль и Т-клетки размораживали в контролируемых условиях и разбавляли в Т-клеточной среде (TCM), состоящей из 80% среды Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 и 20% AIM V, дополненной 10% FBS, амфотерицином В, гентамицином, ванкомицин и IL-2 (обозначаемые здесь как ICMT).

Клетки промывали центрифугированием в закрытых мешках, ресуспендировали в ICMT и брали образцы для подсчета клеток. Суспензию клеток высевали в культуральные мешки с ICMT, нацеленные на $0,25 \times 10^6$ жизнеспособных клеток/мл, и инкубировали в контролируемых условиях до 8-го дня процесса. На 8-й день брали образцы для подсчета клеток, в культуральный мешок добавляли равный объем ICMT и инкубировали в контролируемых условиях. На 11-й день проводили подсчет клеток, в культуральный мешок добавляли равный объем ICMT и инкубировали в контролируемых условиях. На 13-й день проводили подсчет клеток, и TIL концентрировали путем центрифугирования в пакете с получением от 1×10^6 до 20×10^6 жизнеспособных Т-клеток.

Также, на 13-й день от 1×10^6 до 20×10^6 жизнеспособных разросшихся TIL активировали с использованием анти-CD3 и облученных питающих клеток (аллогенных PBMC) с помощью TCM, содержащей 8% человеческой сыворотки АВ и IL-2 (в настоящем документе именуемой WTCM). Культуру для активации TIL инкубировали до 6 дней в контролируемых условиях в стационарных культуральных мешках. На 19-й день инкубации проводили подсчет клеток и активированные TIL высевали в биореактор, содержащий WTCM. Клетки инкубировали до 6 дней в контролируемых условиях. На 20-й день для размножения TIL обеспечивали непрерывную подачу TCM с добавлением IL-2 до тех пор, пока не будет достигнута целевая доза сбора до или к 27-му дню процесса.

После достижения дозы для сбора клетки подсчитывали, промывали и концентрировали центрифугированием в фосфатно-солевом буферном растворе (PBS), дополненном 1% человеческим сывороточным альбумином (HSA). TIL в пакете для лекарственного препарата (DP) затем охлаждали до 2-8°C и смешивали 1:1 с криопротектором, содержащим 16% HSA и 20% DMSO с получением окончательного состава DP в PBS, содержащего 8,5% HSA и 10% DMSO. Объемы образцов удаляли для тестирования выпуска партии, эталонных и резервных образцов.

Составленный DP подвергали криоконсервации в CRF с использованием предварительно определенной программы до тех пор, пока продукт не достигнет заданной температуры. Затем криоконсервированные DP переносили в хранилище с жидким азотом перед транспортировкой при температуре $\leq -130^{\circ}\text{C}$ в клиники для введения.

Оборудование/Поставка	Производитель	Модель или номер по каталогу
Пробирки Leukosep ficoll	Greiner Bio-One Lrd	227288
Пакет для клеточных культур PermaLife, 325 мл	Origen Biomeical Inc	PL325-2G
Пакет для размножение клеточных культур	Charter Medical Ltd.	EXP-1L
Пакет WAVE 10 л	Cytiva	29-1084-43
Набор CT800.1 Sefia kit	Cytiva	20001

Реагент	Производитель	Номер по каталогу	Партия #	Срок годности #
Т-клеточная среда	Life Technologies	04196658P	2021537	31.Aug.2020
Гамма-облученные FBS	Life Technologies	01190005H-RESERVE 2-2YBT2DS	2225231RP	31.May.2024
Флакон производителя пролейкина (IL-2)	Clinigen Group PLC	Proleukin	801313T	31.Dec.2020
Разделенный на аликвоты сток IL-2	N/A	N/A	CTU-IL2/02/09/2019	31.Aug.2020
Гентамицин/Амфотерицин раствор (500x)	Life Technologies	R01510	2217613	30.Mar.2021
Флакон производителя ванкомицина	Bowmed Ibisqus	N/A	90260	28.Feb.2021
Разделенный на аликвоты ванкомицин (50 мг/мл)	N/A	N/A	CTU-12-06-2020	28.Feb.2021
Гамма-облученная сыворотка человека AB	Gemini Bio-Products LLC	100-812G	H12Y00K	30.Sept.2020
Флакон производителей ОКТ-3 (1 г/мл)	Miltenyi Biotec Ltd	170-076-116	6200108211	17.Oct.2020
Разделенный на аликвоты ОКТ-3	N/A	N/A	CYU-ОКТ3/05/05/2020	17.Oct.2020

20% Человеческий сывороточный альбумин	Nova Biologics Inc	68982-0633-02	M848B6661	27.Nov.2021
CryoSure DMSO	WAK-Chemie Medical GmbH	WAK-DMSO-50	USP8C1S	28.Feb.2022

Пример 11

Изготовление в полном масштабе выполняли согласно условиям GMP. Процесс ITIL-168, используемый в этих экспериментах, включал использование криоконсервированного расщепленного материала опухоли, цель $0,25 \times 10^6$ жизнеспособных клеток/мл посева для стадии выращивания TIL (стадия 1), непрерывную переработку от выращивания TIL до фазы быстрого размножения TIL (REP), автоматизированное составление конечного продукта и криоконсервацию конечного лекарственного препарата.

ITIL-168 представляет собой терапию опухоль-инфильтрирующими лимфоцитами (TIL) для лечения взрослых пациентов с прогрессирующей меланомой, у которых возник рецидив или которые являются рефрактерными по меньшей мере к одной предшествующей линии терапии. ITIL-168 состоит из однократного вливания аутологичных Т-клеток, выделенных и размноженных ex-vivo из раковой ткани пациента и вводимых внутривенно. Со временем были выявлены и реализованы усовершенствования процесса, который получил название ITIL-168. В таблице обобщены варианты и процесса и оборудование.

Таблица 14 – Краткое описание разработки производственного процесса

Стадия процесса	Отдельная операция /Изменение	MS v1.0	MS v1.1	UTIL-01	Процесс ITIL-168
Подготовка расщепленного материала опухоли	Дезагрегация опухоли	Ручная дезагрегация в бутылках	Ручная дезагрегация в бутылках	Автоматизированная дезагрегация (с использ. устройства Tiss-u-stor)	Автоматизированная дезагрегация (с использ. устройства Tiss-u-stor)
	Составление расщепленного материала	Не-криоконсерв.	Не-криоконсерв.	Криоконсервированный	Криоконсервированный
Выращивание TIL	Культурал. сосуды для расщепл. мат. опухоли	Открытый процесс в планшетах	Открытый процесс в планшетах	Открытый процесс в планшетах	Закрытый процесс в пакетах

	Плотность высевания	Цель 1×10^6 жизнесп-ных клеток/мл	Цель 1×10^6 жизнесп-ных клеток/мл	Цель $0,5 \times 10^6$ жизнесп-ных клеток/мл	Цель $0,25 \times 10^6$ жизнесп-ных клеток/мл
	Способ подсчета количества клеток	Гемоцитометр	Проточная цитометрия	Проточная цитометрия	Проточная цитометрия
	Материал	Гентамицин & Амфотерицин В	Гентамицин & Амфотерицин В	Гентамицин & Амфотерицин В	Гентамицин, Амфотерицин В, & Ваанкомицин
	Материал	Инактивация нагреванием и 0,1 мкм фильтрация FBS	Инактивация нагреванием и 0,1 мкм фильтрация FBS	Инактивация нагреванием и 0,1 мкм фильтрация FBS	Инактивация нагреванием и 0,1 мкм фильтрация облученной FBS
TIL REP	Материал	Инактивация нагреванием и 0,1 мкм фильтрация чел. АВ доноров	Инактивация нагреванием и 0,1 мкм фильтрация чел. АВ доноров	Инактивация нагреванием и 0,1 мкм фильтрация чел. АВ доноров	Инактивация нагреванием и 0,1 мкм фильтрация облученной чел. АВ доноров
Выращив. TIL до REP	После выращ. TIL, криоконсерв., оттаивание/ промывка и восстановл.	Стадия выдержки во время криоконсерв. и через 1-3 дня после восстановл. оттаиванием	Стадия выдержки во время криоконсерв. и через 1-3 дня после восстановл. оттаиванием	Непрерывная переработка без криоконсервации	Непрерывная переработка без криоконсервации
Сбор для составления лекарств. препарата	Лекарств. препарат	Haemonetics Cell Saver 5 (Ручное составление 270 мл)	Haemonetics Cell Saver 5 (Ручное составление 270 мл)	Haemonetics Cell Saver 5 (Ручное составление 270 мл)	Cytiva Sefia S-2000 (Автоматизированное составление 110 мл)
Составление лекарств. препарата	Лекарств. препарат	Не-криоконсервированный	Не-криоконсервированный	Криоконсервированный	Криоконсервированный

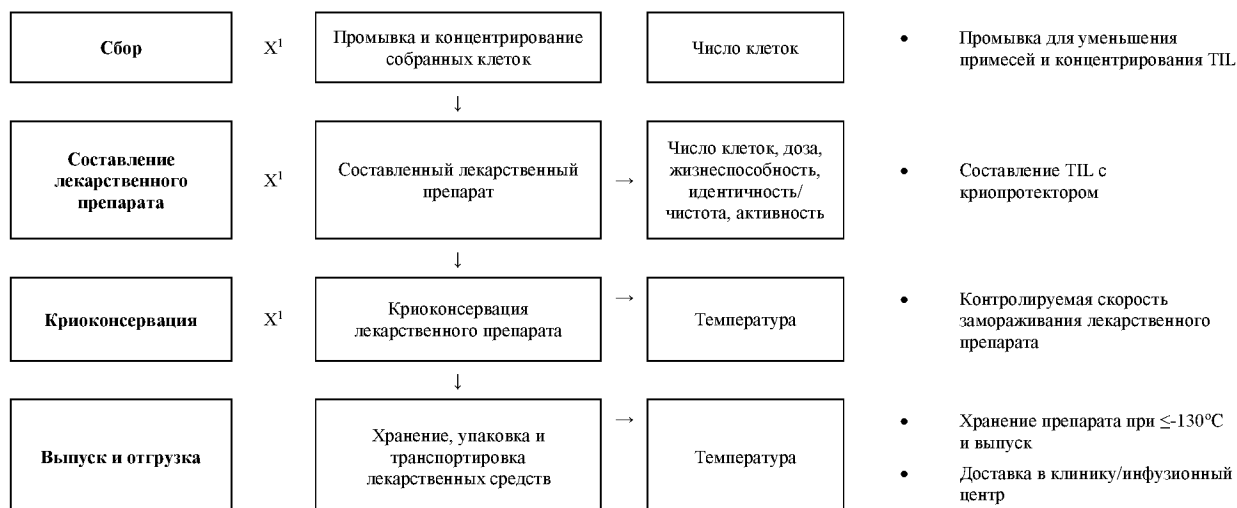
В таблице 15 показан обзор производственного процесса ITIL-168, использованного в двух прогонах разработки процесса. Два прогона разработки процесса, обозначенные как прогон 1 (TIL065) и прогон 2 (Biopartners 9251), выполнялись в полном масштабе согласно условиям GMP и использовали избыточную опухоль, взятую от пациента, и опухоль, полученную от поставщика – Biopartners, соответственно.

Во время этих двух прогонов разработки процесса внутрипроизводственное тестирование на биологическую нагрузку и стерильность конечного продукта, тесты на эндотоксины, микоплазму и внешний вид не проводились, поскольку эти прогоны в основном предназначались для оценки производительности производственного

процесса и качества продукции после усовершенствования процесса, а также служат в качестве обучающих прогонов для операторов производства согласно условиям GMP перед проверкой процесса.

Таблица 15 - Блок-схема производственного процесса ITIL-168 Process

Стадия процесса	День	Отдельная операция	Контроль процесса	Описание
Получение и выпуск		Получение, проверка и выпуск криоконсервированного опухолевого гидролизата		<ul style="list-style-type: none"> Получение, проверка и выпуск дайджеста криоконсервированной опухоли
Выращивание TIL		↓		
	1	Оттаивание и промывка криоконсервированного опухолевого гидролизата		<ul style="list-style-type: none"> Оттаивание, промывка и разбавление опухолевого гидролизата в среде с добавлением FBS, IL-2 и противомикробных реагентов.
		↓		
	1	Посев выращенных TIL	→ Число клеток	<ul style="list-style-type: none"> Посев отмытых клеток в пакет(ы) для культивирования в среде с добавлением FBS, IL-2 и противомикробных реагентов.
		↓		
	1	Инкубация выращенных TIL		<ul style="list-style-type: none"> Инкубация отмытых клеток в пакетах для культивирования в среде с добавлением FBS, IL-2 и противомикробных реагентов до 12 дней.
		↓		
	8	Добавление среды для выращивания TIL	→ Число клеток	<ul style="list-style-type: none"> Продолжающееся размножение TIL в средах с добавлением FBS, IL-2 и противомикробных реагентов.
	↓			
	11	Добавление среды для выращивания TIL	→ Число клеток	<ul style="list-style-type: none"> Продолжающееся распространение TIL в средах с добавлением FBS, IL-2 и противомикробных реагентов.
	↓			
	13	Концентрация выращенных TIL	→ Число клеток	<ul style="list-style-type: none"> Концентрирование TIL центрифугированием в пакете(ах)
Фаза быстрого размножения TIL		↓		
	13	Активация TIL	→ Число клеток	<ul style="list-style-type: none"> Активация TIL с помощью анти-CD3 и облученных питающих клеток в среде, содержащей сыворотку человека АВ и IL-2, до 6 дней в культуральном пакете(ах) Криоконсервация излишков TIL, при наличии.
		↓		
	19	Посев TIL в биореакторе	→ Число клеток	<ul style="list-style-type: none"> Посев TIL в биореакторе в среде с добавлением человеческой сыворотки АВ и IL-2 на срок до 8 дней.
	↓			
	20-27	Размножение TIL в биореакторе (Перфузия)	→ Число клеток	<ul style="list-style-type: none"> Размножение TIL в биореакторном пакете с непрерывной подачей среды с добавлением IL-2
		↓		



Выращивание ТП и РЕР выполняли, как в примере 10, с использованием материалов, показанных в таблице 12 и таблице 13.

Для обоих прогонов (прогон 1 и прогон 2) общее количество клеток CD3⁺ измеряли в дни 1, 8, 11 и 13 для стадии выращивания ТП или стадии 1, а также в дни 13, 19, 22 и 25 для стадии быстрого размножения (РЕР) ТП или стадии 2 в соответствии с протоколом серийного производства (BMR). На ФИГ. 76А и 76В показано общее количество клеток CD3⁺ для двух прогонов на стадии выращивания ТП (стадия 1) и на стадии ТП РЕР (стадия 2), соответственно. Данные, показанные на ФИГ. 76В, демонстрируют, что для обоих прогонов к концу стадии РЕР было достигнуто $>1 \times 10^{10}$ клеток CD3⁺, в результате чего обе партии соответствовали критериям приемлемости дозы от 5×10^9 до 5×10^{10} клеток CD3⁺.

Жизнеспособность (процент жизнеспособных клеток CD3⁺) также измеряли для обоих прогонов в дни 1, 8, 11, 13 и 25. На ФИГ. 76С показано, что жизнеспособность увеличивалась в ходе производственного процесса и ближе к концу стадии РЕР, и оба прогона соответствовали критериям конечного продукта $>70\%$.

Кратное размножение для фазы быстрого размножения (РЕР) рассчитывали по данным подсчета клеток для двух прогонов. Кроме того, параметры качества конечного продукта, такие как доза, жизнеспособность, активность, фенотип Т-клеток и поднаборы Т-клеток, также оценивали для двух прогонов разработки процесса.

Данные, представленные в таблице 16, демонстрируют, что после усовершенствований процесс производства ИТЛ-168 работает аналогично историческому процессу и приводит к характеристикам качества конечного продукта, которые соответствуют требованиям спецификации.

Таблица 16 - Производительность производственного процесса ITIL-168 и атрибуты качества продукции				
Прогон	Кратное размножение во время REP (Абсолютное)	Доза (Общее кол-во жизнеспособных клеток CD3+)	Жизнеспособность (%)	Активность¹ (%)
Критерии приемлемости / Требования спецификации	NA	$5 \times 10^9 - 5 \times 10^{10}$	≥ 70	≥ 40
Наблюдаемый исторический диапазон	395 – 7526 (n = 22)	$7.90 \times 10^9 - 6.25 \times 10^{10}$ (n=23)	80 – 99 (n = 23)	Исторические остатки в процессе тестирования
Прогон 1	1350	3×10^{10}	90	63.2
Прогон 2	1700	2×10^{10}	88	65.2
¹ Активность рассчитывается как частота всех жизнеспособных клеток CD2+, положительных по одному или нескольким из CD137, CD107a, TNF- α и IFN- γ .				

Пример 12 - Введение

Терапия

Субъекты получали схему химиотерапии с лимфодеплецией циклофосфамидом и флударабином. Терапия предназначена для снижения влияния подавляющих клеток, таких как регуляторные Т-клетки, и для увеличения экспрессии цитокинов, стимулирующих рост лимфоцитов (например, IL-7 и IL-15). Режим гидратации проводили до и во время лимфодеплетирующей химиотерапии. Антимикробную и противогрибковую профилактику инициировали до начала лимфодеплетирующей химиотерапии. Оценивали и управляли лихорадкой и нейтропенией. Нестероидную противорвотную терапию начинали до лимфодеплетирующей химиотерапии и продолжали по мере необходимости.

Лимфодеплетирующую химиотерапию проводили следующим образом. Дозы вводимых циклофосфамида и флударабина рассчитывали на основе оценки массы тела, полученной при исходном посещении. У лиц с ожирением (индекс массы тела >35) использовали фактическую массу тела. Доза циклофосфамида зависит от массы тела, а доза флударабина зависит от площади поверхности тела. Дозы могут быть округлены в большую или меньшую сторону в соответствии с практикой распределения доз. В

следующей таблице предствалены рекомендуемые дозы, пути введения, объемы инфузии и продолжительность:

Таблица 17 – Режим лимфодеплетирующей химиотерапии				
День	Лекарственное средство	Доза	Способ введения	Введение
-7	Флударабин	25 мг/м ²	IV	В 10-100 мл 0,9% NaCl в течение приблизительно 30 мин.
	Циклофосфамид	60 мг/кг	IV	В 500 мл 0,9% NaCl в течение приблизительно 1 ч
-6	Флударабин	25 мг/м ²	IV	В 10-100 мл 0,9% NaCl в течение приблизительно 30 мин
	Циклофосфамид	60 мг/кг	IV	В 500 мл 0,9% NaCl в течение приблизительно 1 ч
-5	Флударабин	25 мг/м ²	IV	В 10-100 мл 0,9% NaCl в течение приблизительно 30 мин
-4	Флударабин	25 мг/м ²	IV	В 10-100 мл 0,9% NaCl в течение приблизительно 30 мин
-3	Флударабин	25 мг/м ²	IV	В 10-100 мл 0,9% NaCl в течение приблизительно 30 мин
-2	День отдыха			
-1	День отдыха			

Таблица 18 - – Коррекция дозы флударабина	
Клиренс креатинина (определяется по формуле Кокрофта-Голта)	Доза флударабина
>/= 70 мл/мин	25 мг/м ²
51-69 мл/мин	20 мг/м ²

Субъектам предварительно вводили антигистаминный препарат и ацетаминофен перед инфузией ТП. Содержимое инфузионного пакета вводили с использованием нелейкодеплетирующего фильтра (например, встроенного/трубочного фильтра >/= 170 микрон). Субъекты получали до 8 доз П-2 внутривенно для постинфузионной поддержки. П-2 вводили после завершения инфузии ТП, начиная с 0-го дня и продолжая до 4-го дня.

Пример 13 - Результаты лечения

В общей сложности 44 пациента с метастатической меланомой кожи подвергли резекции опухоли и инициировали производственный процесс Выращивания ТП (стадия 1). Из этих 44 пациентов партии от 42 индивидуальных пациента завершили стадию 1 с 2 неудачными попытками. Партии от тридцати одного пациента были запущены в производство REP (стадия 2). Одна партия потерпела неудачу в производственном процессе выращивания ТП на стадии 1 и был реализован пересмотренный производственный процесс на стадии 1, который обеспечил успешное производство на стадии 2. В последующем пациент получал лечение. Остальные 12 партий не были отобраны для начала REP по следующим причинам: 8 из-за интеркуррентного клинического ухудшения состояния пациентов, делающего их непригодными для терапии ТП, 2 пациента больше не нуждались в ТП из-за клинического улучшения на фоне других методов лечения, 1 пациент не смог обеспечить финансирование лечения, и 1 партия не была произведена из-за отсутствия опухолевой ткани на иссеченном образце. Партии от четырех пациентов были успешно изготовлены, однако пациенты были признаны клинически непригодными для терапии ТП и, следовательно, не получали лечения.

Из 44 опухолей, которые были резецированы, 2 потерпели неудачу в производстве, что дает 95% успешности производства. Двадцать семь пациентов лечились продуктами ТП, изготовленными с использованием стандартного производственного процесса. На момент завершения производства ТП 6 из этих пациентов были признаны клинически непригодными для полного режима лечения и получали значительно более низкие дозы кондиционирующей химиотерапии и постинфузионного П-2, поэтому они были исключены из анализа. У одного пациента была проведена резекция опухоли, которая не соответствовала критериям для начала стандартной производственной стадии выращивания ТП (стадия 1). Поэтому была инициирована модифицированная стадия 1, которая сделала возможным протокол быстрого размножения (стадия 2) и составление конечного продукта, хотя и с очень низкой конечной дозой клеток ($1,7 \times 10^9$). Поскольку этот продукт был произведен с использованием модифицированного производственного процесса и дал низкую дозу клеток, он не считался репрезентативным для процесса лицензирования MS, и поэтому клинические данные были исключены из анализа.

Были собраны и проанализированы демографические данные, исходные характеристики пациентов, подробности лечения и характер лечения, а также результаты клинической эффективности и безопасности остальных 21 пациента. К дате

окончания анализа эти пациенты имели среднее потенциальное время последующего наблюдения 52,2 месяца (диапазон: 4,6, 98,8 месяцев) с даты инфузии TIL.

Среди этих 21 пациента большинство (71%) были мужчинами, а средний возраст на момент лечения TIL составлял 45 лет (диапазон: 16, 68). На исходном уровне у всех пациентов была метастатическая меланома кожи IV стадии с медианой 39 месяцев с момента первоначального диагноза меланомы (диапазон: 8, 177). У большинства (67%) пациентов были зарегистрированы поражения более чем в 3 очагах заболевания, в том числе 7 (33%) с метастазами в головной мозг, зарегистрированными во время лечения TIL. Среднее количество предшествующих системных терапий было 2 (диапазон: 1, 9). Пятьдесят два процента (52%) пациентов имели мутацию BRAF, все из которых получали и прогрессировали на ингибиторе BRAF с ингибитором MEK или без него. Все пациенты, кроме двух (90%), ранее получали по меньшей мере один ингибитор контрольной точки, а 12 (57%) получали ингибитор PD-1 (ниволумаб или пембролизумаб). Кроме того, 8 (38%) получали ипилимумаб и либо ниволумаб, либо пембролизумаб, вводимые последовательно, а 4 (19%) получали ипилимумаб и ниволумаб одновременно. Перед резекцией опухоли для производства TIL у 20 (95%) была рецидивирующая или рефрактерная прогрессирующая меланома, а 1 (5%) прекратил лечение перед терапией TIL из-за непереносимости.

Непосредственно перед введением TIL у 10 (48%) пациентов наблюдались повышенные уровни лактодегидрогеназы (LDH) в сыворотке, причем у 7 (33%) в 1-2 раза превышал верхний предел нормального диапазона (ULN) и у 3 (14%) более чем в 2 раза превышал ULN. Исходная опухолевая нагрузка, измеренная по сумме размеров поражений (SLD) целевых поражений, имела для 20 пациентов; медиана исходного SLD составляла 100 мм (диапазон: 13, 281).

Лечение с помощью TIL

Все 21 пациент получили 2 дозы циклофосфида и 5 доз флударабина в качестве кондиционирующей химиотерапии перед инфузией TIL. Среднее общее количество введенных клеток TIL составляло $31,9 \times 10^9$ (диапазон: $7,9 \times 10^9$, $62,5 \times 10^9$). Среднее общее количество доз IL-2 составило 8 (диапазон: 4, 11). Пациенты оставались в клинике в среднем 10 дней (диапазон: 7, 15). Трое (14%) пациентов были госпитализированы в отделение интенсивной терапии в течение периода лечения.

Сообщалось о клинически значимых неблагоприятных явлениях (AE) в течение периода лечения с помощью TIL. Распространенные AE ($\geq 10\%$), о которых сообщалось в период кондиционирующей химиотерапии, включали нейтропению

(43%) и тошноту (19%), и в целом соответствовали профилю побочных эффектов, вызываемых этими химиотерапевтическими агентами.

Распространенные АЕ, возникающие после инфузии ТП, включали тромбоцитопению (62%), лихорадку (57%), озноб (43%), тахикардию (29%), нейтропению (29%), отек легких (24%), пропотевание жидкости из сосудов (24%), сыпь (19%), мерцательную аритмию (14%), сердечно-сосудистую нестабильность (14%), инфекцию грудной клетки (14%) и отек (14%) (таблица 19). Эти нежелательные явления согласуются с теми, о которых сообщалось в других исследованиях ТП (Dafni et al, 2019; Rohaan et al, 2018).

Пациент, чей производственный процесс не прошел стадию 1, но который получал лечение продуктом, полученным в результате модифицированного производственного процесса, умер на 6-й день после терапии ТП из-за обширной опухолевой нагрузки, усугубленной почечной недостаточностью, перегрузкой жидкостью и возможным сепсисом.

Таблица 19. Неблагоприятные явления (АЕ) с началом после инфузии ТП (все субъекты, получавшие лечение)

Название АЕ – n (%)	Все получившие лечение субъекты (N=21)
Тромбоцитопения	13 (61.9)
Пирексия	12 (57.1)
Озноб	9 (42.9)
Нейтропения	6 (28.6)
Тахикардия	6 (28.6)
Отек легких	5 (23.8)
Пропотевание жидкости из сосудов	5 (23.8)
Сыпь	4 (19.0)
Мерцательная аритмия	3 (14.3)
Сердечно-сосудистая нестабильность	3 (14.3)
Инфекция нижних дыхательных путей	3 (14.3)
Отек	3 (14.3)
Спутанность сознания	2 (9.5)
Гипокалиемия	2 (9.5)
Гипотензия	2 (9.5)
Неврологический дефицит	2 (9.5)
Почечная недостаточность	2 (9.5)
Респираторный сепсис	2 (9.5)
Судорожный приступ	2 (9.5)
Сепсис	2 (9.5)
Витилиго	2 (9.5)
Набор веса	2 (9.5)

Синдром легочной обструкции	2 (9.5)
Кашель	1 (4.8)
Диарея	1 (4.8)
Дисфагия	1 (4.8)
Синдром приживления	1 (4.8)
Галлюцинации	1 (4.8)
Летаргия	1 (4.8)
Инфекция центрального венозного катетера	1 (4.8)
Плевральный выпот	1 (4.8)
Пневмония	1 (4.8)
Пневмонит	1 (4.8)
Респираторные проблемы	1 (4.8)
Учащенное дыхание	1 (4.8)

Показатели периферической крови измеряли в течение периода лечения. На момент начала кондиционирующей химиотерапии наблюдалась тенденция к снижению количества нейтрофилов, тромбоцитов, лимфоцитов, количества лейкоцитов и гемоглобина. Количество клеток крови и уровень гемоглобина обычно достигали минимума через 1-4 дня после инфузии ТП. Восстановление показателей в анализе крови до исходного уровня обычно наблюдалось примерно через 7 дней после даты инфузии ТП.

Недавнее изменение производственного процесса было реализовано для повышения надежности и обеспечения возможности проведения многоцентровых клинических испытаний с централизованным производством. В этом обновлении расщепленный опухолевой материал подвергается криоконсервации для продления стабильности. Важно отметить, что у четырех пациентов, получавших продукты, изготовленные с предварительным криоконсервированием, наблюдаемый профиль АЕ в целом соответствовал таковому у других пациентов, получавших лечение в сериях (таблица 20), и тому, о котором сообщалось в клинических испытаниях других продуктов ТП.

Таблица 20. АЕ, возникающие после инфузии ТП (субъекты, получавшие криоинъекционные препараты)

Название АЕ- n (%)	Все получившие лечение пациенты (N=4)
Тромбоцитопения	4 (100)
Пирексия	2 (50.0)
Сыпь	2 (50.0)

Озноб	2 (50.0)
Гипотензия	1 (25.0)
Почечная недостаточность	1 (25.0)
Пропотевание жидкости из сосудов	1 (25.0)
Витилиго	1 (25.0)

Пятнадцать из 21 пациента подверглись оценке заболевания с помощью серийных сканирований КТ и/или МРТ, которые включали рентгенологические измерения целевых поражений. Среди этих пациентов частота количественного ответа (подтверждение ответа не требовалось) составила 53%, включая 2 (13%) пациентов, достигших CR, и 6 (40%) пациентов, достигших PR (таблица 21).

Таблица 21. Сводные данные по лучшему общему ответу (набор анализов, оценивающих эффективность)

	Набор анализов, оценивающих эффективность (N=15)
Лучший общий ответ	
Полный ответ (CR)	2 (13.3)
95% CI (метод Клоппера-Пирсона)	1.7, 40.5
Частичный ответ (PR)	
Частичный ответ (PR)	6 (40.0)
95% CI (метод Клоппера-Пирсона)	16.3, 67.7
Стабильное заболевание (SD)	
Стабильное заболевание (SD)	3 (20.0)
95% CI (метод Клоппера-Пирсона)	4.3, 48.1
Прогрессирующее заболевание (PD)	
Прогрессирующее заболевание (PD)	4 (26.7)
95% CI (метод Клоппера-Пирсона)	7.8, 55.1
Частота ответов (CR + PR)	
Частота ответов (CR + PR)	8 (53.3)
95% CI (метод Клоппера-Пирсона)	26.6, 78.7
Уровень контроля заболевания (CR + PR + SD)	
Уровень контроля заболевания (CR + PR + SD)	11 (73.3)
95% CI (метод Клоппера-Пирсона)	44.9, 92.2

Частота ответа, включая всех пациентов, на основании как количественного, так и качественного ответа, составила 57%, включая 3 (14%) пациентов, достигших CR, и 9 (43%) пациентов, достигших PR. Еще у двух пациентов развилась резистентность к ингибитору BRAF дабрафенибу, и у них наблюдалось прогрессирование заболевания на терапии, прежде чем они были направлены на лечение TIL. Дабрафениб был отменен непосредственно перед терапией TIL и возобновлен примерно через 1-2

недели после ТП для предотвращения быстрого роста опухоли, который часто сопровождается прекращением дабрафениба. Каждый из этих 2 пациентов достиг качественного ответа после ТП (1 стойкий CR и 1 PR). Оба пациента впоследствии прекратили прием дабрафениба, только однажды после ответа на ТП. Поскольку у обоих этих пациентов было заболевание, которое стало резистентным к дабрафенибу, разумно сделать вывод, что клиническая польза, которую они получили после ТП, была связана с ТП, а не с временным возобновлением приема дабрафениба. Поэтому был проведен анализ чувствительности ответа, включая этих пациентов в качестве ответивших на лечение. В этом анализе чувствительности частота ответов составила 14/21 (67%) с 4 (19%) полными ответами и 10 (48%) частичными ответами (таблица 22).

Таблица 22. Сводные данные лучшего общего ответа, анализ чувствительности (все получавшие лечение субъекты)

	Все получавшие лечение субъекты (N=21)
Лучший общий ответ	
Полный ответ (CR)	4 (19.0)
95% CI (метод Клоппера-Пирсона)	5.4, 41.9
Частичный ответ (PR)	10 (47.6)
95% CI (метод Клоппера-Пирсона)	25.7, 70.2
Стабильное заболевание (SD)	4 (19.0)
95% CI (метод Клоппера-Пирсона)	5.4, 41.9
Прогрессирующее заболевание (PD)	3 (14.3)
95% CI (метод Клоппера-Пирсона)	3.0, 36.3
Частота ответа (CR + PR)	14 (66.7)
95% CI (метод Клоппера-Пирсона)	43.0, 85.4
Уровень контроля заболевания (CR + PR + SD)	18 (85.7)
95% CI (метод Клоппера-Пирсона)	63.7, 97.0

Ответы в целом были одинаковыми в подгруппах по важным исходным характеристикам и характеристикам заболевания, включая возраст, количество участков заболевания, количество предшествующих линий терапии, предшествующий ингибитор BRAF, предшествующий ингибитор PD-1, исходный уровень метастазирования в головной мозг и исходную опухолевую массу. Примечательно, что у 4 пациентов, которых лечили с помощью производственного процесса, наиболее

похожего на ITL-168, общая частота ответов (75%) и частота полного ответа (25%) соответствовали более широкой популяции. Из 15 пациентов с количественным ответом, основанным на КТ и/или МРТ, у 14 были проведены подробные измерения опухоли, а максимальный процент уменьшения опухоли по сравнению с исходным уровнем был представлен на каскадной диаграмме (ФИГ. 74). У одного пациента был наилучший общий ответ на PD, но не сообщалось о каких-либо показателях целевых поражений после лечения (прогрессирование определялось наблюдением за новыми поражениями), и поэтому он не был представлен на графике.

Среднее время выживаемости без прогрессирования заболевания (PFS) по данным количественных ответов (N = 15) составляло 6,7 месяца, при этом у 4 пациентов наблюдался постоянный ответ (2 CR и 2 PR) без какой-либо последующей терапии на момент проведения анализа. Среднее время PFS, основанное как на количественных, так и на качественных данных ответа (N = 21), составило 6,7 месяца, при этом у 5 субъектов наблюдался постоянный ответ (3 CR и 2 PR) без какой-либо последующей терапии. Среднее время общей выживаемости (ОВ) у всех 21 пролеченного пациента составило 21,3 месяца (ФИГ. 75А). Среднее время OS у 15 пациентов с количественными данными ответа составило 16 месяцев (ФИГ. 75В). Однако среднее время OS для ответивших на лечение (только количественный ответ, N = 8) не было достигнуто, тогда как среднее время OS для не ответивших на лечение (N = 7) составило 6,5 месяцев (ФИГ. 75С).

Пример 14. Генетически модифицированные ТТЛ

Таблица 19 – Реагенты и оборудование		
Реагент	Производитель	Номер по каталогу
15 мл полипропиленовые центрифужные пробирки	Appleton Woods	AB031
50 мл полипропиленовые центрифужные пробирки	Appleton Woods	AB028
Физиологический раствор, забуференный фосфатом Дульбекко	Sigma-Aldrich	D8537-24X500ML
Фетальная бычья сыворотка (инактивированная нагреванием)	Sigma-Aldrich	F9665-500ML
ТСМ- СТ4834/GIBCO CUSTOM P158718	Gibco	
Пенициллин-Стрептомицин	Sigma-Aldrich	P0781-100ML
ТС 6-луночный планшет	StarLab	CC7682-7506

Стерильная 1,5 мл пробирка Эппендорфа	StarLab	S1615-5510
He-TC 96-луночный планшет с плоским дном	Falcon	353072
96 луночный планшет с U-дном	Falcon	351177
FACS пробирка	SLS	352063
TC 24-луночный планшет	StarLab	CC7682-7524
Микропланшет для суспензионной культуры, 96 луночный, F-дно	Grenier, Bio-One	655185
T cell TransACT (TM), человека	Miltenyi	130-111-160
Гентамицин амфотерицин	Invitrogen (ThermoFisher Scientific)	10184583
Пролейкин (Алдеслейкин) IL-2	Novartis	PL-00101/0936
Центрифуга Heraeus Megafuge 40R, Refrigerated Centrifuge	Thermo Scientific	75004518
Инкубатор IncuSafe CO2	PHCBI	MCO-170AIC-PE
Система проточной цитометрии NovoCyte 3005 (CE-IVD)	Agilent Technologies	2010064D
Программное обеспечение NovoExpress Software	Agilent Technologies	

Криопробирки с расщепленным материалом опухоли удаляли из хранилища с жидким азотом и оттаивали на водяной бане при 37°C до тех пор, пока клеточная суспензия не расплавится (D1). Клеточную суспензию переносили в 15-мл сосуд Falcon, доводили до 10 мл с помощью PBS, центрифугировали при 400 g в течение 5 мин и декантировали надосадочную жидкость.

Клеточный осадок ресуспендировали в предварительно нагретой подходящей среде для Т-клеток и проводили подсчет клеток для определения жизнеспособности с использованием трипанового синего. Клетки ресуспендировали при плотности 1×10^6 клеток на мл.

Клетки, предназначенные для культивирования без активации, ресуспендировали при концентрации $0,5 \times 10^6$ клеток на мл и 2 мл (1×10^6 клеток) помещали в лунку 24-луночного планшета для тканевых культур с IL-2 (3000 МЕ/мл). Клетки культивировали во влажном инкубаторе при 37°C до трансдукции с добавлением IL-2 (3000 МЕ/мл) каждые 2-3 дня.

Для клеток, подлежащих трансдукции в D3 и D4, активация клеток происходит в D1. Для клеток, подлежащих трансдукции в день D7 и D8, активация клеток происходит в день D5.

Для активации TIL $0,5 \times 10^6$ клеток/мл помещали в 24-луночный планшет для тканевых культур с 3000 МЕ/мл IL-2. 10 мкл T-cell TransACT (TM) добавляли на 1×10^6 клеток суспензии TIL (соотношение 1:1) и клетки инкубировали в течение 48 часов в инкубаторе при 37°C.

Первый день трансдукции (D3 или D7)

Соберите клетки из 24-луночного планшета в пробирку Falcon объемом 15 мл, долейте 10 мл TCM и вращайте при 400 g в течение 5 мин. Подсчитайте клетки с помощью трипанового синего и ресуспендируйте в концентрации 1×10^6 клеток на мл.

Используйте 1×10^5 клеток (100 мкл) на лунку в 96-луночном планшете с плоским дном для каждого метода трансдукции. При трансдукции в 24-луночном планшете, поместите 1×10^6 клеток на лунку (500 мкл). При трансдукции в 6-луночном планшете поместите 5×10^6 клеток на лунку (2 мл).

Подготовьте мастермикс лентивируса (MOI5) и IL-2 (3000 МЕ/мл) путем ресуспендирования в TCM до конечного объема 100 мкл на 10^5 клеток на условие (или соответствующую плотность и объем для 24-луночных и 6-луночных планшетов). Подготовьте объем мастермикса для количества лунок +1, чтобы учесть потери при пипетировании.

Для NT-клеток (МОСК) подготовьте мастермикс TCM и IL-2 (3000 МЕ/мл) на 100 мкл в 96-луночном планшете с плоским дном. Для 24-луночных и 6-луночных планшетов ресуспендируйте T-клетки МОСК в 500 мкл и 2 мл, соответственно, с IL-2 (3000 МЕ/мл).

Удалите супернатант из клеток в пробирках Eppendorf или 15 мл Falcon и ресуспендируйте клетки в соответствующих 100 мкл мастермикса на 1×10^5 клеток (или подходящей плотности и объема для 24-луночных и 6-луночных планшетов) в зависимости от условия.

Ресуспендируйте надлежащим образом при каждом условии и перенесите клетки на 96-луночные, 24-луночные или 6-луночные планшеты без TC с плоским дном, соответственно.

При трансдукции 96-луночного планшета добавьте 200 мкл PBS в окружающие лунки для предотвращения испарения.

Инкубируйте клетки в течение ночи во влажном инкубаторе при 37°C.

Второй день трансдукции (D4 или D8)

Соберите клетки путем ресуспендирования вверх и вниз из 96-луночных планшетов с плоским дном и перенесите в 96-луночный планшет с U-образным дном.

(Сбор из 24-луночных или 6-луночных планшетов проводят в Falcon объемом 15 мл.)
Вращайте планшет при 400 г в течение 5 мин и промойте клетки TCM.

Используйте 1×10^5 клеток (100 мкл) на лунку в 96-луночном планшете с плоским дном для каждого метода трансдукции. При трансдукции в 24-луночном планшете поместите 1×10^6 клеток на лунку (500 мкл). При трансдукции в 6-луночном планшете поместите 5×10^6 клеток на лунку (2 мл).

Подготовьте мастермикс лентивируса (MOI5) и IL-2 (3000 МЕ/мл) путем ресуспендирования в TCM до конечного количества 100 мкл на 10^5 клеток на условие (или соответствующую плотность и объем для 24-луночных и 6-луночных планшетов). Подготовьте объем мастермикса для количества лунок +1, чтобы учесть потери при пипетировании.

Для NT-клеток (МОСК) подготовьте мастер-микс TCM и IL-2 (3000 МЕ/мл) на 100 мкл для 96-луночного планшета с плоским дном. Для 24-луночных и 6-луночных планшетов ресуспендируйте T-клетки МОСК в 500 мкл и 2 мл, соответственно, с IL-2 (3000 МЕ/мл).

Удалите супернатант из клеток в пробирках Eppendorf или Falcon и ресуспендируйте клетки в соответствующих 100 мкл мастермикса на 1×10^5 клеток (или подходящей плотности и объема для 24-луночных и 6-луночных планшетов) в зависимости от условия.

Ресуспендируйте надлежащим образом при каждом условии и перенесите клетки на 96-луночные, 24-луночные или 6-луночные планшеты без TC с плоским дном, соответственно. При трансдукции в 96-луночном планшете добавьте 200 мкл PBS в окружающие лунки, чтобы предотвратить испарение. Инкубируйте клетки в течение ночи во влажном инкубаторе при 37°C.

На следующий день перенесите клетки в новые 96-луночные планшеты с круглым дном, 24-луночные или 6-луночные планшеты в свежей среде с IL-2 (3000 МЕ/мл) и инкубируйте в течение 72 часов во влажном инкубаторе при 37°C.

Конечный объем для 96-луночного планшета составляет 200 мкл на лунку; конечный объем для 24-луночного планшета составляет 2 мл на лунку; конечный объем для 6-луночного планшета составляет 5 мл на лунку. IL-2 (3000 МЕ/мл) добавляйте каждые 2-3 дня.

Клетки окрашивали для определения эффективности трансдукции на D8 для трансдукций в дни D3+D4, и на D12 для трансдукций в дни D7+D8.

Выращивание TILS

Имитационные и трансдуцированные клетки поддерживаются в 96-луночных планшетах с U-образным дном до тех пор, пока их не переместят в REP.

Для поддержания клеток каждые 2-3 дня половину среды удаляют и заменяют свежими TCM и IL-2 (3000 ME/мл). Для 96-луночного планшета удаляют и заменяют 100 мкл среды до конечного объема 200 мкл. Для 24-луночного планшета удаляют и заменяют 1 мл среды до конечного объема 2 мл. Для 6-луночного планшета удаляют и заменяют 1 мл среды до конечного объема 2 мл.

REP начинают на D13 (12 дней выращивания).

Изобретение дополнительно описывается в следующих пронумерованных абзацах:

1. Способ выделения терапевтической популяции криоконсервированных немодифицированных инфилтрирующих опухоль лимфоцитов (UTIL), включающий: (a) асептическую дезагрегацию опухоли, резецированной у субъекта, с получением таким образом дезагрегированной опухоли, при этом опухоль является достаточно дезагрегированной, чтобы можно было криоконсервировать клеточную суспензию; (b) криоконсервацию дезагрегированной опухоли в тот же день, что и стадия (a), путем охлаждения или поддержания при низкой температуре; (c) необязательное хранение криоконсервированной дезагрегированной опухоли; (d) выполнение первого размножения путем культивирования дезагрегированной опухоли в среде для культивирования клеток, содержащей IL-2, с получением первой популяции UTIL; (e) выполнение второго размножения путем культивирования первой популяции UTIL с дополнительным количеством IL-2, ОКТ-3, и антигенпрезентирующими клетками (APC) с получением второй популяции TIL; и (f) сбор и/или криоконсервацию второй популяции UTIL.

2. Способ по п. 1, в котором дезагрегация включает физическую дезагрегацию, ферментативную дезагрегацию или физическую и ферментативную дезагрегацию.

3. Способ по п. 1 или 2, в котором охлаждение осуществляется с контролируемой скоростью.

4. Способ по п. 3, в котором контролируемая скорость замораживания составляет от примерно $-2^{\circ}\text{C}/\text{минуту}$ до примерно -60°C .

5. Способ по любому из пп. 1-5, в котором дезагрегированная опухоль является целлюляризованной.

6. Способ по любому из пп. 1-5, в котором дезагрегированную опухоль очищают.
7. Способ по любому из пп. 1-6, в котором суспензию из отдельных клеток получают после стадии (а).
8. Способ по любому из пп. 1-7, в котором первая популяция УТИЛ составляет примерно 1-20 миллионов УТИЛ.
9. Способ по любому из пп. 1-8, в котором стадия (d) дополнительно включает выращивание УТИЛ из исходного материала опухоли с последующим быстрым размножением на стадии (е).
10. Способ по п. 9, в котором стадию (d) проводят в течение примерно двух недель, и стадию (е) проводят в течение примерно двух недель.
11. Способ по любому из пп. 1-10, в котором стадия (d) и/или стадия (е) дополнительно включает добавление П-7, П-12, П-15, П-18, П-21 или их комбинации.
12. Способ по любому из пп. 1-11, дополнительно включающий стадию (g) суспендирования второй популяции УТИЛ.
13. Способ по п. 12, в котором суспендирование проводят в забуференном солевом растворе, сывороточном альбумине человека и диметилсульфоксиде (DMSO).
14. Способ по любому из пп. 1-13, в котором стадия (f) представляет собой криоконсервацию и дополнительно включает заключительную стадию оттаивания УТИЛ.
15. Способ по п. 14, в котором оттаявшие УТИЛ готовы для инфузии в виде однократной дозы без каких-либо дополнительных модификаций.
16. Терапевтическая популяция криоконсервированных немодифицированных инфильтрирующих опухоль лимфоцитов (УТИЛ), полученная с помощью способа по любому из пп. 1-15.
17. Терапевтическая популяция по п. 16, где популяция содержит примерно от 5×10^9 до 5×10^{10} Т-клеток.
18. Криоконсервированный пакет терапевтической популяции по пп. 16 или 17.
19. Криоконсервированный пакет по п. 18 для использования при внутривенном вливании.
20. Способ лечения рака, включающий введение терапевтической популяции по пп. 14 или 15 или криоконсервированного пакета по пп. 18 или 19.

21. Способ по п. 20, в котором рак представляет собой рак мочевого пузыря, рак молочной железы, рак, вызванный вирусом папилломы человека, рак шейки матки, рак головы и шеи (включая плоскоклеточный рак головы и шеи (HNSCC), рак легкого, меланому, рак яичников, немелкоклеточный рак легкого (NSCLC), рак почки или почечно-клеточную карциному.

Изобретение дополнительно описывается следующими пронумерованными абзацами:

1. Способ выделения терапевтической популяции криоконсервированных немодифицированных инфильтрирующих опухоль лимфоцитов (UTIL), включающий: (a) резекцию опухоли у субъекта; (b) хранение резецированной опухоли в одноразовом асептическом наборе, при этом асептический набор содержит: модуль дезагрегации для получения и обработки материала, содержащего солидную ткань млекопитающего; дополнительный модуль обогащения для фильтрации дезагрегированного материала солидных тканей и разделения недеагрегированных тканей и фильтрата; и модуль стабилизации для необязательной дальнейшей обработки и/или хранения дезагрегированного материала продукта, при этом каждый из модулей содержит один или несколько гибких контейнеров, соединенных одной или несколькими трубками, предназначенными для обеспечения движения материала ткани между ними; и при этом каждый из модулей содержит одно или несколько отверстий для обеспечения возможности асептического ввода сред и/или реагентов в один или несколько гибких контейнеров; (c) асептическую дезагрегацию резецированной опухоли в модуле дезагрегации, в результате чего получается дезагрегированная опухоль, при этом резецированная опухоль является достаточно дезагрегированной, если ее можно криоконсервировать без повреждения клеток; (d) криоконсервацию дезагрегированной опухоли в модуле стабилизации; (e) выполнение первого размножения путем культивирования дезагрегированной опухоли в среде для культивирования клеток, содержащей IL-2, с получением первой популяции UTIL; (f) выполнение второго размножения путем культивирования первой популяции UTIL с дополнительным количеством IL-2, ОКТ-3, и антигенпрезентирующими клетками (APC) с получением второй популяции TIL; (g) сбор и/или криоконсервацию второй популяции UTIL. В некоторых вариантах осуществления стадия a) является необязательной.

2. Способ по п. 1, в котором дезагрегация включает физическую дезагрегацию, ферментативную дезагрегацию или физическую и ферментативную дезагрегацию.

3. Способ по п. 1 или 2, в котором дезагрегированная опухоль является целлюляризованной.
4. Способ по любому из пп. 1-3, в котором суспензию из отдельных клеток получают после стадии (с).
5. Способ по любому из пп. 1-4, в котором первая популяция УТИЛ содержит примерно 1-20 миллионов УТИЛ.
6. Способ по любому из пп. 1-5, в котором стадия (е) дополнительно включает выращивание УТИЛ из исходного материала резецированной опухоли с последующим быстрым размножением на стадии (f).
7. Способ по п. 6, в котором стадию (е) проводят в течение примерно двух недель, и стадию (f) проводят в течение примерно двух недель.
8. Способ по любому из пп. 1-7, в котором стадия (d) и/или стадия (е) дополнительно включает добавление П-7, П-12, П-15, П-18, П-21 или их комбинации.
9. Способ по любому из пп. 1-7, дополнительно включающий стадию (h) суспендирования второй популяции УТИЛ.
10. Способ по п. 9, в котором суспендирование проводят в забуференном солевом растворе, сывороточном альбумине человека и диметилсульфоксиде (DMSO).
11. Способ по любому из пп. 1-9, в котором стадия (g) представляет собой криоконсервацию и дополнительно включает заключительную стадию оттаивания УТИЛ.
12. Способ по п. 10, в котором оттаявшие УТИЛ готовы для инфузии в виде однократной дозы без каких-либо дополнительных модификаций.
13. Терапевтическая популяция криоконсервированных УТИЛ, полученная с помощью способа по любому из пп. 1-11.
14. Терапевтическая популяция по п. 13, где популяция содержит примерно от 5×10^9 до 5×10^{10} Т-клеток.
15. Криоконсервированный пакет терапевтической популяции по пп. 13 или 14.
16. Криоконсервированный пакет по п. 15 для использования при внутривенном вливании.
17. Способ лечения рака, включающий введение терапевтической популяции по пп. 13 или 14 или криоконсервированного пакета по пп. 15 или 16.

18. Способ по п. 17, в котором рак представляет собой рак мочевого пузыря, рак молочной железы, рак, вызванный вирусом папилломы человека, рак шейки матки, рак головы и шеи (включая плоскоклеточный рак головы и шеи (HNSCC), рак легкого, меланому, рак яичников, немелкоклеточный рак легкого (NSCLC), рак почки или почечно-клеточную карциному.

19. Способ по п. 1, в котором один или несколько гибких контейнеров асептического набора содержат упругий деформируемый материал.

20. Способ по п. 1, в котором один или несколько гибких контейнеров модуля дезагрегации асептического набора содержат одно или несколько запечатываемых отверстий.

21. Способ по п. 20, в котором гибкий контейнер модуля дезагрегации асептического набора содержит термосвариваемый шов.

22. Способ по п. 1, в котором один или несколько гибких контейнеров асептического набора имеют закругленные внутрь края.

23. Способ по п. 1, в котором один или несколько гибких контейнеров модуля дезагрегации асептического набора содержат поверхности дезагрегации, адаптированные для механического раздавливания и рассечения в них солидной ткани.

24. Способ по п. 1, в котором один или несколько гибких контейнеров модуля обогащения асептического набора содержат фильтр, который удерживает ретентат целлюляризованной дезагрегированной солидной ткани.

25. Способ по п. 1, в котором один или несколько гибких контейнеров модуля стабилизации асептического набора содержат состав среды для хранения жизнеспособных клеток в растворе или в криоконсервированном состоянии.

26. Способ по п. 1, где асептический набор дополнительно содержит цифровой, электронный или электромагнитный индикатор-метку.

27. Способ по п. 26, в котором метка-индикатор асептического набора относится к конкретной программе, которая определяет: тип процесса дезагрегации и/или обогащения, и/или стабилизации; один или несколько типов среды, используемых в этих процессах; включая дополнительный раствор для замораживания, подходящий для замораживания с регулируемой скоростью.

28. Способ по п. 1, в котором один и тот же гибкий контейнер может составлять часть одного или нескольких из модуля дезагрегации, модуля стабилизации и необязательного модуля обогащения.

29. Способ по п. 1, в котором модуль дезагрегации асептического набора содержит первый гибкий контейнер для приема ткани, подлежащей переработке.

30. Способ по п. 1, в котором модуль дезагрегации асептического набора содержит второй гибкий контейнер, содержащий среду для дезагрегации.

31. Способ по п. 1, в котором необязательный модуль обогащения асептического набора содержит первый гибкий контейнер и третий гибкий контейнер для приема обогащенного фильтрата.

32. Способ по п. 1, в котором как модуль дезагрегации, так и модуль стабилизации асептического набора содержат второй гибкий контейнер, и при этом второй контейнер содержит среду для расщепления и среду для стабилизации.

33. Способ по п. 1, в котором модуль стабилизации асептического набора содержит четвертый гибкий контейнер, содержащий стабилизирующую среду.

34. Способ по п. 1, в котором модуль стабилизации асептического набора также содержит первый гибкий контейнер и/или третий гибкий контейнер для хранения и/или криоконсервации.

35. Способ выделения терапевтической популяции криоконсервированных немодифицированных инфильтрирующих опухоль лимфоцитов (UTIL), включающий: (а) резекцию опухоли у субъекта; (b) хранение резецированной опухоли в автоматизированном устройстве для полуавтоматизированной асептической дезагрегации и/или обогащения, и/или стабилизации клеток или клеточных агрегатов из солидной ткани млекопитающих, включающем программируемый процессор и одноразовый асептический набор, причем асептический набор содержит: модуль дезагрегации для приема и переработки материала, содержащего солидную ткань млекопитающего; дополнительный модуль обогащения для фильтрации дезагрегированного материала солидной ткани и разделения недезагрегированных тканей и фильтрата; и модуль стабилизации для необязательной дальнейшей обработки и/или хранения дезагрегированного материала продукта, при этом каждый из модулей содержит один или несколько гибких контейнеров, соединенных одной или несколькими трубками, предназначенными для обеспечения движения материала ткани между ними; и при этом каждый из модулей содержит одно или несколько отверстий для обеспечения возможности асептического ввода сред и/или реагентов в один или несколько гибких контейнеров; (с) дезагрегацию резецированной опухоли в асептических условиях с образованием дезагрегированной опухоли, при этом резецированная опухоль является достаточно дезагрегированной, если ее можно

криоконсервировать без повреждения клеток; (d) криоконсервацию дезагрегированной опухоли в модуле стабилизации; (e) выполнение первого размножения путем культивирования дезагрегированной опухоли в среде для культивирования клеток, содержащей IL-2, с получением первой популяции UTP; (f) выполнение второго размножения путем культивирования первой популяции UTP с дополнительным количеством IL-2, ОКТ-3, и антигенпрезентирующими клетками (АРС) с получением второй популяции TP; (g) сбор и/или криоконсервацию второй популяции UTP. В некоторых вариантах осуществления стадия а) является необязательной.

36. Способ по п. 35, в котором автоматизированное устройство дополнительно содержит считыватель меток радиочастотной идентификации для распознавания асептического набора.

37. Способ по п. 36, в котором программируемый процессор автоматизированного устройства способен распознавать асептический набор по метке и впоследствии исполнять программу набора, определяющую тип процессов дезагрегации, обогащения и стабилизации, и соответствующие типы среды, необходимые для этих процессов.

38. Способ по п. 35, в котором программируемый процессор автоматизированного устройства приспособлен для связи и управления одним или несколькими из: модуля дезагрегации; модуля обогащения; и модуля стабилизации.

39. Способ по п. 38, в котором программируемый процессор автоматизированного устройства управляет модулем дезагрегации, чтобы обеспечить физическое и/или биологическое разрушение материала солидной ткани.

40. Способ по п. 39, в котором программируемый процессор управляет модулем дезагрегации, чтобы обеспечить физическое и ферментативное расщепление материала солидной ткани.

41. Способ по п. 40, в котором ферментативное расщепление материала солидной ткани осуществляется одним или несколькими растворами ферментов среды, выбранными из коллагеназы, трипсина, липазы, гиалуронидазы, дезоксирибонуклеазы, либеразы HI, пепсина или их смесей.

42. Способ по п. 35, в котором программируемый процессор управляет поверхностями дезагрегации внутри гибких контейнеров для дезагрегации, которые механически раздавливают и разрезают солидную ткань, при этом поверхности дезагрегации необязательно представляют собой механические поршни.

43. Способ по п. 35, в котором программируемый процессор управляет модулем стабилизации для криоконсервации обогащенной дезагрегированной солидной ткани в контейнере, необязательно с использованием программируемой температуры.

44. Способ по п. 35, где автоматизированное устройство дополнительно содержит один или несколько дополнительных компонентов в любой комбинации: датчики, способные распознавать, был ли завершен процесс дезагрегации в модуле дезагрегации перед переносом дезагрегированной солидной ткани в необязательный модуль обогащения; датчики веса для определения количества носителя, необходимого в контейнерах одного или нескольких из модуля дезагрегации; модуля обогащения; и/или модуля стабилизации и управления переносом материала между соответствующими контейнерами; датчики для контроля температуры внутри контейнеров одного или нескольких модулей дезагрегации; модуль обогащения; и/или модуль стабилизации; по меньшей мере один пузырьковый датчик для управления переносом среды между входными и выходными отверстиями каждого контейнера в модуле; по меньшей мере один насос, необязательно перистальтический насос, для управления перемещением среды между входными и выходными отверстиями; датчики давления для оценки давления внутри модуля обогащения; один или несколько клапанов для управления процессом фильтрации с тангенциальным потоком в модуле обогащения; и/или один или несколько зажимов для управления перемещением среды между входными и выходными отверстиями каждого модуля.

45. Способ по п. 35, в котором программируемый процессор адаптирован для поддержания оптимального диапазона температур хранения в модуле стабилизации до тех пор, пока контейнер не будет удален; или исполняет стадию контролируемого замораживания.

46. Способ по п. 35, в котором автоматизированное устройство дополнительно содержит пользовательский интерфейс.

47. Способ по п. 46, в котором интерфейс содержит экран дисплея для отображения инструкций, которые направляют пользователя для ввода параметров, подтверждения предварительно запрограммированных стадий, предупреждения об ошибках или их комбинации.

48. Способ по п. 35, в котором автоматизированное устройство адаптировано для транспортировки.

49. Способ полуавтоматизированной асептической переработки ткани для выделения терапевтической популяции UTIL, включающий следующие стадии: (a) автоматизированное определение стадий асептической дезагрегации ткани и связанных с ними состояний по цифровому, электронному или электромагнитному индикатору-метке, связанному с набором для асептической обработки, при этом асептический набор содержит: модуль дезагрегации для приема и переработки материала, содержащего солидную ткань млекопитающего; дополнительный модуль обогащения для фильтрации дезагрегированного материала солидной ткани и разделения недезагрегированных тканей и фильтрата; и модуль стабилизации для необязательной дальнейшей переработки и/или хранения дезагрегированного материала продукта, при этом каждый из модулей содержит один или несколько гибких контейнеров, соединенных одной или несколькими трубками, адаптированными для обеспечения движения материала ткани между ними; и при этом каждый из модулей содержит одно или несколько отверстий для обеспечения возможности асептического ввода сред и/или реагентов в один или несколько гибких контейнеров; (b) резекцию опухоли у субъекта; (c) помещение опухоли в гибкий пластиковый контейнер модуля дезагрегации асептического набора; (d) обработку опухоли путем автоматизированного исполнения одной или нескольких стадий обработки ткани посредством связи с модулем дезагрегации и управления им; при этом резецированная опухоль подвергается асептической дезагрегации, в результате чего образуется дезагрегированная опухоль, при этом резецируемая опухоль является достаточно дезагрегированной, если ее можно криоконсервировать без повреждения клеток; необязательный модуль обогащения, в котором дезагрегированная опухоль фильтруется для удаления дезагрегированного материала твердой ткани и для разделения недезагрегированной ткани и фильтрата; модуль стабилизации, в котором дезагрегированная опухоль подвергается криоконсервации; (e) выполнение первого размножения путем культивирования дезагрегированной опухоли в среде для культивирования клеток, содержащей IL-2, с получением первой популяции UTIL; (f) выполнение второго размножения путем культивирования первой популяции UTIL с дополнительным количеством IL-2, ОКТ-3, и антигенпрезентирующими клетками (APC) с получением второй популяции ТП; и (g) сбор и/или криоконсервацию второй популяции UTIL.

Изобретение дополнительно описывается следующими пронумерованными абзацами:

1. Гибкий контейнер для переработки ткани, содержащий: один или несколько слоев, изготовленных из герметизируемого полимера, при этом по меньшей мере три края гибкого контейнера запечатаны при изготовлении; открытый край на гибком контейнере, через который вводится тканевый материал во время использования; и один или несколько коннекторов, выполненных с возможностью соединения гибкого контейнера по меньшей мере с одним элементом через трубку; при этом секция вблизи открытого края запечатывается после того, как тканевый материал помещен внутри гибкого контейнера, с образования шва.

2. Гибкий контейнер по п. 1, в котором шов имеет участок шириной по меньшей мере три мм, параллельный открытому краю и отстоящий от открытого края гибкого контейнера.

3. Гибкий контейнер по п. 1 дополнительно содержит зажим, имеющий выступы и расположенный рядом со швом и отстоящий от открытого края гибкого контейнера дальше, чем шов.

4. Гибкий контейнер по п. 3, в котором во время использования комбинация шва и зажима выполнена с возможностью выдерживать силу в 100 Н, приложенную к гибкому контейнеру.

5. Гибкий контейнер по п. 3, в котором во время использования комбинация шва и зажима выполнена с возможностью выдерживать силу в 75 Н, приложенную к гибкому контейнеру.

6. Гибкий контейнер по п. 1, в котором шов имеет участок шириной по меньшей мере 5 мм, параллельный открытому краю и отстоящий от открытого края гибкого контейнера.

7. Гибкий контейнер по п. 1, где гибкий контейнер используется для дезагрегации тканевого материала.

8. Гибкий контейнер по п. 1, где гибкий контейнер используется для дезагрегации тканевого материала, фильтрации дезагрегированного тканевого материала и разделения недезагрегированной ткани и фильтрата.

9. Гибкий контейнер по п. 1, дополнительно содержащий упругий деформируемый материал.

10. Гибкий контейнер по п. 1, дополнительно содержащий один или несколько индикаторов.

11. Гибкий контейнер по п. 1, дополнительно содержащий одну или несколько меток.

12. Гибкий контейнер по п. 1, в котором шов сформирован с использованием термосварочного аппарата, работающего при заданном давлении, заданной температуре и в заданном временном интервале.

13. Гибкий контейнер по п. 1, где гибкий контейнер сконфигурирован для использования с устройством, которое механически измельчает тканевый материал, помещенный в гибкий контейнер.

14. Гибкий контейнер по п. 1, где гибкий контейнер выполнен с возможностью срезания тканевого материала.

15. Применение гибкого контейнера по п. 1 в полуавтоматизированном или автоматизированном процессе для асептической дезагрегации, стабилизации и необязательного обогащения клеток млекопитающих или клеточных агрегатов.

16. Система для извлечения желаемого материала из ткани, включающая: набор, содержащий: гибкий контейнер для дезагрегации; гибкий контейнер для стабилизации; и по меньшей мере одну индикаторную метку, расположенную по меньшей мере на одном из гибкого контейнера для дезагрегации или гибкого контейнера для стабилизации, способную обеспечить информацию по меньшей мере об одном из источника ткани, статуса ткани, или идентификатор; элемент дезагрегации, способный обрабатывать по меньшей мере часть ткани в гибком контейнере для дезагрегации с образованием переработанной жидкости; элемент обогащения, способный обогащать по меньшей мере часть переработанной жидкости с образованием желаемого материала; элемент стабилизации, способный хранить часть желаемого материала в гибком контейнере для стабилизации; и по меньшей мере один считыватель индикаторной метки, расположенный по меньшей мере на одном из элемента дезагрегации или элемента стабилизации, способной обеспечить информацию по меньшей мере об одном из источника ткани или статуса ткани на элементе стабилизации.

17. Система по п. 15, в которой желаемый материал содержит инфильтрирующие опухоль лимфоциты (TIL).

18. Система по п. 15, в которой один или несколько типов среды используются в процессах элементом дезагрегации и элементом стабилизации.

19. Система по п. 15, дополнительно содержащая криоконсервирующую среду для использования в элементе стабилизации, способную осуществлять замораживание с регулируемой скоростью.

20. Система по п. 15, в которой гибкий контейнер для дезагрегации содержит пакет для дезагрегации, имеющий открытый край, который запечатывается во время использования, и гибкий контейнер для стабилизации представляет собой пакет для стабилизации.

21. Автоматизированное устройство для полуавтоматизированной асептической дезагрегации и/или обогащения, и/или стабилизации клеток или клеточных агрегатов из солидной ткани млекопитающих, содержащее: программируемый процессор; и набор, содержащий по меньшей мере один гибкий контейнер по любому из пунктов 1-15 в качестве гибкого контейнера для дезагрегации.

22. Автоматизированное устройство по п. 21, дополнительно содержащее считыватель индикаторной метки.

23. Автоматизированное устройство по п. 21, дополнительно содержащее считыватель меток радиочастотной идентификации для распознавания компонента набора.

24. Автоматизированное устройство по п. 21, в котором программируемый процессор способен распознавать компонент набора по метке и впоследствии исполнять программу, определяющую тип процессов дезагрегации, обогащения и стабилизации, и соответствующие типы среды, необходимые для этих процессов.

25. Автоматизированное устройство по п. 21, в котором программируемый процессор управляет модулем дезагрегации автоматизированного устройства, чтобы обеспечить физическое и/или биологическое разрушение материала солидной ткани в гибком контейнере для дезагрегации.

26. Автоматизированное устройство по п. 25, в котором программируемый процессор управляет поверхностью дезагрегации вблизи гибкого контейнера для дезагрегации, который механически раздавливает и разрезает солидную ткань, расположенную в гибком контейнере для дезагрегации, при этом поверхности дезагрегации необязательно представляют собой механические поршни.

27. Автоматизированное устройство по п. 21, в котором программируемый процессор управляет элементом дезагрегации автоматизированного устройства, чтобы обеспечить физическое и ферментативное разрушение солидной ткани в гибком контейнере для дезагрегации.

28. Автоматизированное устройство по п. 27, в котором ферментативное расщепление твердой ткани осуществляется одним или несколькими растворами

ферментов среды, выбранными из коллагеназы, трипсина, липазы, гиалуронидазы, дезоксирибонуклеазы, либеразы HI, пепсина или их смесей.

29. Автоматизированное устройство по п. 21, где устройство содержит по меньшей мере два из элемента дезагрегации; элемент обогащения; и элемента стабилизации; и при этом программируемый процессор выполнен с возможностью связи и управления одним или несколькими из элемента дезагрегации; элемента обогащения; и элемента стабилизации.

30. Автоматизированное устройство по любому из п. 29, в котором программируемый процессор управляет элементом стабилизации для криоконсервации обогащенной дезагрегированной солидной ткани в контейнере для криоконсервации, необязательно с использованием программируемой температуры.

31. Автоматизированное устройство по любому из п. 29, где устройство дополнительно содержит один или несколько дополнительных компонентов в любой комбинации: датчики, способные распознавать, был ли завершен процесс дезагрегации в элементе дезагрегации перед переносом дезагрегированной солидной ткани в необязательный элемент обогащения; датчики веса для определения количества среды, необходимой в контейнерах одного или нескольких из модуля дезагрегации; модуля обогащения; и/или модуля стабилизации, и управления переносом материала между соответствующими контейнерами; датчики для контроля температуры внутри контейнеров одного или нескольких из элемента дезагрегации; элемента обогащения; и/или элемента стабилизации; по меньшей мере один пузырьковый датчик для управления переносом среды между входными и выходными отверстиями каждого контейнера в элементе; по меньшей мере один насос, необязательно перистальтический насос, для управления переносом среды между входными и выходными отверстиями; датчики давления для оценки давления внутри элемента обогащения; один или несколько клапанов для управления процессом фильтрации с тангенциальным потоком в элементе обогащения; и/или один или несколько зажимов для управления переносом среды между входными и выходными отверстиями каждого элемента.

32. Автоматизированное устройство по п. 29, в котором программируемый процессор адаптирован для поддержания оптимального диапазона температур хранения в элементе стабилизации до тех пор, пока контейнер не будет удален; или исполняет стадию контролируемого замораживания.

33. Автоматизированное устройство по любому предшествующему пункту, дополнительно содержащее пользовательский интерфейс.

34. Автоматизированное устройство по п. 26, в котором интерфейс содержит экран дисплея для отображения инструкций, которые направляют пользователя для ввода параметров, подтверждения предварительно запрограммированных стадий, предупреждения об ошибках или их комбинации.

35. Автоматизированное устройство по п. 21, где автоматизированное устройство выполнено с возможностью транспортировки.

36. Способ автоматизированной обработки ткани, включающий: автоматизированное определение условий для стадий обработки и связанных с ними условий по цифровому, электронному или электромагнитному индикатору-метке, связанному с набором; помещение образца ткани в гибкий контейнер набора; и

запечатывание по меньшей мере одного края гибкого контейнера; переработку образца ткани путем автоматизированного исполнения одного или нескольких стадий переработки ткани посредством связи с индикатором и управления гибким контейнером; и фильтрацию по меньшей мере части переработанного образца ткани с получением отфильтрованной жидкости; и подачу по меньшей мере части отфильтрованной жидкости в гибкий контейнер для криоконсервации.

37. Способ по п. 31, в котором переработка включает встряхивание, извлечение и ферментативное расщепление по меньшей мере части образца ткани в гибком контейнере.

38. Способ по п. 31, в котором обработка включает встряхивание, извлечение и ферментативное расщепление по меньшей мере части образца ткани в гибком контейнере, что приводит к извлечению желаемого материала.

39. Способ по п. 31, в котором обработка включает встряхивание, извлечение и ферментативное расщепление по меньшей мере части образца ткани в гибком контейнере, что приводит к выделению инфильтрирующих опухоль лимфоцитов (TIL).

40. Способ по п. 31, в котором гибкий контейнер содержит термосвариваемый материал.

41. Способ по п. 31, в котором гибкий контейнер содержит по меньшей мере один из EVA, смеси винилацетата и полиолефинового полимера или полиамида.

Таким образом, после подробного описания предпочтительных вариантов осуществления настоящего изобретения следует понимать, что изобретение, определенное вышеприведенными пунктами, не должно ограничиваться конкретными деталями, изложенными в приведенном выше описании, поскольку возможны многие

его очевидные варианты без отклонение от сущности или объема настоящего изобретения.

Формула изобретения

1. Способ получения терапевтической популяции инфилтрирующих опухоль лимфоцитов (ТЛ), включающий:

(а) асептическую дезагрегацию опухоли, резецированной у субъекта, с получением таким образом дезагрегированного опухолевого продукта, при этом опухоль является достаточно дезагрегированной для того, чтобы дезагрегированный опухолевый продукт мог быть подвергнут криоконсервации;

(б) охлаждение дезагрегированного опухолевого продукта до подходящей температуры криоконсервации,

(с) выполнение первого размножения путем культивирования криоконсервированного дезагрегированного опухолевого продукта в среде для культивирования клеток, содержащей ИЛ-2, с получением первой популяции ТЛ;

(д) выполнение второго размножения путем культивирования первой популяции ТЛ с дополнительным количеством ИЛ-2, ОКТ-3, и антигенпрезентирующими клетками (АРС) с получением второй популяции ТЛ; и

(е) сбор и/или криоконсервацию второй популяции ТЛ;

при этом дезагрегация включает ферментативную дезагрегацию и/или физическую дезагрегацию, при этом физическая дезагрегация включает многократное физическое давление, оказываемое на удаленную опухоль;

при этом стадии (а)-(е) осуществляют в закрытой системе.

2. Способ по п. 1, в котором дезагрегация включает повторяющееся физическое давление, прилагаемое от 120 до 360 раз в минуту с силой до 6 Н/см², более предпочтительно 3 Н/см².

3. Способ по любому из пп. 1 или 2, в котором дезагрегированный опухолевый продукт представляет собой суспензию из отдельных клеток.

4. Способ по любому из пп. 1-3, в котором резецированную опухоль не фрагментируют до дезагрегации.

5. Способ по любому из пп. 1-4, в котором стадию (а) проводят при температуре, подходящей для ферментативного расщепления.

6. Способ по любому из пп. 1-5, в котором стадия (b) включает охлаждение дезагрегированного опухолевого продукта непосредственно до температуры криоконсервации.

7. Способ по любому из пп. 1-6, в котором период дезагрегации составляет 90 мин или менее, или 75 мин или менее, или 60 мин или менее, или 50 мин или менее.

8. Способ по любому из пп. 1-7, в котором дезагрегация является непрерывной или протекает с периодами по меньшей мере в одну минуту.

9. Способ по любому из пп. 1-8, в котором опухоль не мацерируется.

10. Способ по любому из пп. 1-9, который включает охлаждение дезагрегированного опухолевого продукта в устройстве с регулируемой температурой, запрограммированном на снижение температуры с постоянной скоростью.

11. Способ по п. 10, в котором температура криоконсервации составляет $-80^{\circ}\text{C} \pm 10^{\circ}\text{C}$, и устройство запрограммировано на снижение температуры на $1^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ или $1,5^{\circ}\text{C}/\text{мин}$, или $2^{\circ}\text{C}/\text{мин}$, или $1^{\circ}\text{C}/\text{мин} \pm 0,5^{\circ}\text{C}/\text{мин}$, или $1^{\circ}\text{C}/\text{мин} \pm 0,5^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ или $2^{\circ}\text{C}/\text{мин} \pm 0,5^{\circ}\text{C}/\text{мин}$.

12. Способ по любому из пп. 1-11, где ТП содержат УТПЛ или где ТП содержат МТПЛ.

13. Способ по любому из пп. 1-12, в котором первая популяция ТП составляет примерно 1-20 миллионов ТП.

14. Способ по любому из пп. 1-13, в котором стадия (c) включает выращивание ТП с получением первой популяции, а второе размножение стадии (d) включает быстрое размножение.

15. Способ по любому из пп. 1-14, в котором стадию (c) проводят в течение примерно двух недель, и стадию (d) проводят в течение примерно двух недель.

16. Способ по любому из пп. 1-15, в котором культивирование на стадии (с) и/или стадии (d) включает добавление IL-7, IL-12, IL-15, IL-18, IL-21 или их комбинации.

17. Способ по любому из пп. 1-16, включающий помещение резецированной опухолевой ткани в гибкий контейнер с дезагрегирующей жидкостью, герметизацию контейнера, физическую и/или ферментативную дезагрегацию опухолевой ткани и криоконсервацию дезагрегированной опухолевой ткани.

18. Терапевтическая популяция криоконсервированных инфильтрирующих опухоль лимфоцитов (TIL), полученная способом по любому из пп. 1-17.

19. Терапевтическая популяция по п. 18, где популяция включает примерно от 5×10^9 до 5×10^{10} Т-клеток.

20. Криоконсервированный пакет терапевтической популяции по п. 18 или 19.

21. Криоконсервированный пакет по п. 20 для внутривенного вливания.

22. Способ получения терапевтической популяции инфильтрирующих опухоль лимфоцитов (TIL), включающий:

(a) асептическую дезагрегацию опухоли, резецированной у субъекта, с получением таким образом дезагрегированного опухолевого продукта, где опухоль является достаточно дезагрегированной для того, чтобы дезагрегированный опухолевый продукт мог быть подвергнут криоконсервации;

(b) выполнение первого размножения путем культивирования криоконсервированного дезагрегированного опухолевого продукта в среде для культивирования клеток, содержащей IL-2, с получением первой популяции TIL;

(c) выполнение второго размножения путем культивирования первой популяции TIL с дополнительным количеством IL-2, ОКТ-3, и антигенпрезентирующими клетками (APC) с получением второй популяции TIL; и

(d) сбор и/или криоконсервация второй популяции TIL;

при этом дезагрегация включает ферментативную дезагрегацию и/или физическую дезагрегацию, при этом физическая дезагрегация включает многократное физическое давление, оказываемое на удаленную опухоль;

при этом стадии (a)-(d) осуществляют в закрытой системе.

23. Способ по п. 22, в котором дезагрегация включает повторяющееся физическое давление, применяемое от 120 до 360 раз в минуту с силой до 6 Н/см^2 , более предпочтительно 3 Н/см^2 .

24. Способ по любому из пп. 22 или 23, в котором дезагрегированный опухолевый продукт содержит суспензию из отдельных клеток.

25. Способ по любому из пп. 22-24, в котором резецированную опухоль не фрагментируют до дезагрегации.

26. Способ по любому из пп. 22-25, в котором стадию (a) проводят при температуре, подходящей для ферментативного расщепления.

27. Способ по любому из п. 22-26, при этом период дезагрегации составляет 90 мин или менее, или 75 мин или менее, или 60 мин или менее, или 50 мин или менее.

28. Способ по любому из пп. 22-27, в котором дезагрегация является непрерывной или происходит с периодами по меньшей мере в одну минуту.

29. Способ по любому из пп. 22-28, в котором опухоль не мацерируется.

30. Способ по любому из пп. 22-29, который включает охлаждение продукта дезагрегированной опухоли в устройстве с регулируемой температурой, запрограммированном на снижение температуры с постоянной скоростью.

31. Способ по п. 30, в котором температура криоконсервации составляет - составляет $-80^\circ\text{C} \pm 10^\circ\text{C}$, и устройство запрограммировано на снижение температуры на 1°C/мин или $1,5^\circ\text{C/мин}$, или 2°C/мин , или $1^\circ\text{C/мин} \pm 0,5^\circ\text{C/мин}$, или $1^\circ\text{C/мин} \pm 0,5^\circ\text{C/мин}$ или $2^\circ\text{C/мин} \pm 0,5^\circ\text{C/мин}$.

32. Способ по любому из пп. 22-31, в котором ТП содержат УТП или в котором ТП содержат МТП.

33. Способ по любому из пп. 22-32, в котором первая популяция ТП составляет примерно 1-20 миллионов ТП.

34. Способ по любому из пп. 22-33, в котором стадия (b) включает выращивание ТП с получением первой популяции, и второе размножение на стадии c) включает быстрое размножение.

35. Способ по любому из пп. 22-34, в котором стадию (b) проводят в течение примерно двух недель, и стадию (c) проводят в течение примерно двух недель.

36. Способ по любому из пп. 22-35, в котором культивирование на стадии (b) и/или стадии (c) включает добавление П-7, П-12, П-15, П-18, П-21 или их комбинации.

37. Способ по любому из пп. 22-36, включающий помещение резецированной опухолевой ткани в гибкий контейнер с дезагрегирующей жидкостью, герметизацию контейнера, физическую и/или ферментативную дезагрегацию опухолевой ткани и криоконсервацию дезагрегированной опухолевой ткани.

38. Терапевтическая популяция криоконсервированных лимфоцитов, инфильтрирующих опухоль (ТП), полученная способом по любому из пп. 22-37.

39. Терапевтическая популяция по п. 38, где популяция включает примерно от 5×10^9 до 5×10^{10} Т-клеток.

40. Криоконсервированный пакет терапевтической популяции по п. 38 или 39.

41. Криоконсервированный пакет по п. 40 для применения при внутривенном вливании.

42. Способ получения терапевтической популяции инфильтрирующих опухоль лимфоцитов (TIL) в закрытой системе, включающий:

(a) (i) криоконсервацию резецированной опухоли и дезагрегацию криоконсервированной опухоли, или

(ii) дезагрегацию резецированной опухоли и криоконсервацию дезагрегированной опухоли, или

(iii) криоконсервацию резецированной опухоли и разделение опухоли на несколько фрагментов опухоли, или

(iv) переработку резецированной опухоли на несколько фрагментов опухоли и криоконсервацию фрагментов опухоли,

(b) выполнение первого размножения путем культивирования криоконсервированного дезагрегированного опухолевого продукта в среде для культивирования клеток, содержащей ИЛ-2, с получением первой популяции TIL;

(c) выполнение второго размножения путем культивирования первой популяции TIL с дополнительным количеством ИЛ-2, ОКТ-3, и антигенпрезентирующими клетками (APC) с получением второй популяции TIL; и

(d) сбор и/или криоконсервацию второй популяции TIL.

43. Способ по п. 42, в котором дезагрегация включает физическую дезагрегацию, ферментативную дезагрегацию или физическую и ферментативную дезагрегацию.

44. Способ по любому из пп. 42 или 43, в котором дезагрегация включает многократное физическое давление на резецированную опухоль.

45. Способ по любому из пп. 42-44, в котором дезагрегация включает повторяющееся физическое давление от 120 до 360 раз в минуту с силой до 6 Н/см^2 , более предпочтительно 3 Н/см^2 .

46. Способ по любому из пп. 42-45, в котором физическая дезагрегация включает дробление и резку.

47. Способ по любому из пп. 42-46, в котором криоконсервированная дезагрегированная опухоль содержит суспензию из отдельных клеток.

48. Способ по любому из пп. 42-47, в котором дезагрегацию проводят при температуре, подходящей для ферментативного расщепления.

49. Способ по любому из пп. 42-48, в котором криоконсервация включает охлаждение резецированной или дезагрегированной опухоли непосредственно до заданной температуры криоконсервации.

50. Способ по любому из пп. 42-49, который включает охлаждение резецированной или дезагрегированной опухоли в устройстве с регулируемой температурой, запрограммированном на снижение температуры с постоянной скоростью.

51. Способ по п. 50, в котором температура криоконсервации составляет -- $80^{\circ}\text{C} \pm 10^{\circ}\text{C}$, и устройство запрограммировано на снижение температуры на $1^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ или $1,5^{\circ}\text{C}/\text{мин}$, или $2^{\circ}\text{C}/\text{мин}$, или $1^{\circ}\text{C}/\text{мин} \pm 0,5^{\circ}\text{C}/\text{мин}$, или $1^{\circ}\text{C}/\text{мин} \pm 0,5^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ или $2^{\circ}\text{C}/\text{мин} \pm 0,5^{\circ}\text{C}/\text{мин}$.

52. Способ выделения терапевтической популяции ТП из опухолевой ткани, резецированной у субъекта, включающий:

(а) помещение резецированной опухолевой ткани в автоматизированное устройство для полуавтоматизированной асептической дезагрегации опухолевой ткани, содержащее программируемый процессор и одноразовый асептический набор, при этом асептический набор представляет собой закрытую систему; при этом асептический набор содержит:

модуль дезагрегации для приема и переработки материала, содержащего опухолевую ткань;

дополнительный модуль обогащения для фильтрации дезагрегированного материала солидной ткани и разделения недезагрегированной ткани и фильтрата; и

модуль стабилизации для необязательной дальнейшей переработки и/или хранения дезагрегированного материала продукта,

при этом каждый из модулей содержит один или несколько гибких контейнеров, соединенных одной или несколькими трубками, выполненными с возможностью движения тканевого материала между ними; и

при этом каждый из модулей содержит одно или несколько отверстий для обеспечения возможности асептического ввода среды и/или реагентов в один или несколько гибких контейнеров;

(b) асептическую дезагрегацию резецированной опухоли с образованием дезагрегированной опухоли,

(c) выполнение первого размножения путем культивирования дезагрегированной опухоли в среде для культивирования клеток, содержащей П-2, с получением первой популяции UTIL;

(d) выполнение второго размножения путем культивирования первой популяции UTIL с дополнительным количеством П-2, ОКТ-3, и антигенпрезентирующими клетками (АРС) с получением второй популяции TIL; и

(f) сбор и/или криоконсервацию второй популяции UTIL.

53. Способ по п. 32, в котором дезагрегация включает многократное физическое давление на удаленную опухоль.

54. Способ по любому из пп. 52 или 53, в котором дезагрегация включает повторяющееся физическое давление, применяемое от 120 до 360 раз в минуту с силой до 6 Н/см^2 , более предпочтительно 3 Н/см^2 .

55. Способ по любому из пп. 52-54, в котором резецированную опухоль не фрагментируют до дезагрегации.

56. Способ по любому из пп. 52-55, в котором опухолевая ткань не мацерируется.

57. Способ по любому из пп. 52-56, в котором дезагрегацию проводят в течение 90 мин или менее, или 75 мин или менее, или 60 мин или менее, или 50 мин или менее.

58. Способ по любому из пп. 52-57, в котором после стадии (b) способ включает (b') криоконсервацию дезагрегированной опухоли в модуле стабилизации.

59. Способ по любому из п. 58, в котором стадия (b') включает охлаждение продукта дезагрегированной опухоли непосредственно до температуры криоконсервации.

60. Способ по п. 59, в котором температура криоконсервации составляет $-80^{\circ}\text{C} \pm 10^{\circ}\text{C}$, и устройство запрограммировано на снижение температуры на $1^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ или $1,5^{\circ}\text{C}/\text{мин}$, или $2^{\circ}\text{C}/\text{мин}$, или $1^{\circ}\text{C}/\text{мин} \pm 0,5^{\circ}\text{C}/\text{мин}$, или $1^{\circ}\text{C}/\text{мин} \pm 0,5^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ или $2^{\circ}\text{C}/\text{мин} \pm 0,5^{\circ}\text{C}/\text{мин}$.

61. Способ по любому из пп. 52-60, в котором автоматизированное устройство дополнительно содержит одно или несколько из следующего в любой комбинации:

датчики, способные распознавать, был ли завершен процесс дезагрегации в модуле дезагрегации перед переносом дезагрегированной солидной ткани в необязательный элемент обогащения;

датчики веса для определения количества среды, необходимой в контейнерах одного или нескольких из модуля дезагрегации; модуля обогащения; и/или модуля стабилизации, и управления переносом материала между соответствующими контейнерами;

датчики контроля температуры внутри контейнеров одного или нескольких из модуля дезагрегации; модуля обогащения; и/или модуля стабилизации;

по меньшей мере один пузырьковый датчик для управления переносом среды между входными и выходными отверстиями каждого контейнера в модуле;

по меньшей мере один насос, необязательно перистальтический насос, для управления переносом среды между входными и выходными отверстиями;

датчики давления для оценки давления внутри модуля обогащения;

один или несколько клапанов для управления процессом фильтрации с тангенциальным потоком в модуле обогащения;

и/или один или несколько зажимов для управления переносом среды между входными и выходными отверстиями каждого модуля.

62. Способ по любому из пп. 52-61, в котором программируемый процессор управляет модулем дезагрегации, чтобы обеспечить физическое и ферментативное разрушение материала солидной ткани, и/или в котором программируемый процессор

управляет модулем стабилизации, чтобы криоконсервировать обогащенную дезагрегированную солидную ткань в контейнере.

63. Способ по любому из пп. 52-62, в котором модуль дезагрегации многократно раздавливает и сдвигает опухолевую ткань от 120 до 360 раз в минуту с усилием до 6 Н/см^2 , более предпочтительно 3 Н/см^2 , а модуль стабилизации охлаждает дезагрегированную опухолевую ткань до $-80^\circ\text{C} \pm 10^\circ\text{C}$, и устройство запрограммировано на снижение температуры на 1°C/мин или $1,5^\circ\text{C/мин}$, или 2°C/мин , или $1^\circ\text{C/мин} \pm 0,5^\circ\text{C/мин}$, или $1^\circ\text{C/мин} \pm 0,5^\circ\text{C/мин}$ или $2^\circ\text{C/мин} \pm 0,5^\circ\text{C/мин}$.

64. Гибкий контейнер, подходящий для использования в закрытой системе для выделения терапевтической популяции ТП,

предназначенный для переработки ткани, включающий:

один или несколько слоев из запечатываемого полимера, при этом по меньшей мере три края гибкого контейнера запечатываются при изготовлении;

открытый край на гибком контейнере, через который вводится тканевый материал во время использования; и

один или несколько коннекторов, выполненных с возможностью соединения гибкого контейнера по меньшей мере с одним элементом через трубку;

при этом участок рядом с открытым краем запечатывается после того, как тканевый материал помещается внутри гибкого контейнера, с образованием шва.

65. Гибкий контейнер по п. 64, в котором шов сформирован с использованием термосварочного аппарата, работающего при заданном давлении, заданной температуре и заданном временном интервале.

66. Гибкий контейнер по любому из пп. 64 или 65, где гибкий контейнер сконфигурирован для использования с устройством, которое механически измельчает тканевый материал, помещенный в гибкий контейнер.

67. Гибкий контейнер по любому из пп. 64-66, где гибкий контейнер пригоден для многократного физического давления, прилагаемого от 120 до 360 раз в минуту с силой до 6 Н/см^2 , более предпочтительно 3 Н/см^2 .

68. Система для выделения ТП из опухолевой ткани, включающая: набор, содержащий:

гибкий контейнер для дезагрегации;

гибкий контейнер для стабилизации; и

по меньшей мере одну индикаторную метку, расположенную по меньшей мере на одном из гибкого контейнера для дезагрегации или гибкого контейнера для стабилизации, способную обеспечить информацию по меньшей мере об одном из источника ткани, статуса ткани, или идентификатор;

элемент дезагрегации, способный обрабатывать по меньшей мере часть ткани в гибком контейнере для дезагрегации с образованием переработанной жидкости;

элемент обогащения, способный обогащать по меньшей мере часть переработанной жидкости с образованием желаемого материала;

элемент стабилизации, способный хранить часть желаемого материала в гибком контейнере для стабилизации и необязательно контролировать замораживание; и

по меньшей мере один считыватель индикаторной метки, расположенный по меньшей мере на одном из элемента дезагрегации или элемента стабилизации, способной обеспечить информацию по меньшей мере об одном из источника ткани или статуса ткани на элементе стабилизации.

69. Способ лечения рака у субъекта, включающий:

(a) асептическую дезагрегацию опухоли, резецированной у субъекта, с получением таким образом дезагрегированного опухолевого продукта, при этом опухоль является достаточно дезагрегированной, чтобы дезагрегированный опухолевый продукт мог быть подвергнут криоконсервации;

(b) охлаждение дезагрегированного опухолевого продукта до подходящей температуры криоконсервации,

(c) выполнение первого размножения путем культивирования криоконсервированного дезагрегированного опухолевого продукта в среде для культивирования клеток, содержащей ИЛ-2, с получением первой популяции ТП;

(d) выполнение второго размножения путем культивирования первой популяции ТП с дополнительным количеством ИЛ-2, ОКТ-3, и антигенпрезентирующими клетками (АРС) с получением второй популяции ТП;

- (e) сбор и/или криоконсервацию второй популяции ТП; и
- (f) введение субъекту второй популяции ТП;

при этом дезагрегация включает ферментативную дезагрегацию и/или физическую дезагрегацию, при этом физическая дезагрегация включает многократное физическое давление, оказываемое на резецированную опухоль; при этом стадии (а)-(е) осуществляют в закрытой системе.

70. Способ по п. 69, в котором дезагрегация включает повторяющееся физическое давление от 120 до 360 раз в минуту с силой до 6 Н/см^2 , более предпочтительно 3 Н/см^2 .

71. Способ по любому из пп. 69 или 70, в котором дезагрегированный опухолевый продукт представляет собой суспензию из отдельных клеток.

72. Способ по любому из пп. 69-71, в котором резецированную опухоль не фрагментируют до дезагрегации.

73. Способ по любому из пп. 69-72, в котором стадию (а) проводят при температуре, подходящей для ферментативного расщепления.

74. Способ по любому из пп. 69-73, в котором стадия (b) включает охлаждение дезагрегированного опухолевого продукта непосредственно до температуры криоконсервации.

75. Способ по любому из пп. 69-74, в котором период дезагрегации составляет 90 мин или менее, или 75 мин или менее, или 60 мин или менее, или 50 мин или менее.

76. Способ по любому из пп. 69-75, в котором дезагрегация является непрерывной или происходит с периодами по меньшей мере в одну минуту.

77. Способ по любому из пп. 69-76, в котором опухоль не мацерируется.

78. Способ по любому из пп. 69-77, который включает охлаждение дезагрегированного опухолевого продукта в устройстве с регулируемой температурой, запрограммированном на снижение температуры с постоянной скоростью.

79. Способ по п. 78, в котором температура криоконсервации составляет $-80^{\circ}\text{C} \pm 10^{\circ}\text{C}$, и устройство запрограммировано на снижение температуры на $1^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ или $1,5^{\circ}\text{C}/\text{мин}$, или $2^{\circ}\text{C}/\text{мин}$, или $1^{\circ}\text{C}/\text{мин} \pm 0,5^{\circ}\text{C}/\text{мин}$, или $1^{\circ}\text{C}/\text{мин} \pm 0,5^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ или $2^{\circ}\text{C}/\text{мин} \pm 0,5^{\circ}\text{C}/\text{мин}$

80. Способ по любому из пп. 69-79, где ТП содержат УТП или где ТП содержат МТП.

81. Способ по любому из пп. 69-80, в котором первая популяция ТП составляет примерно 1-20 миллионов ТП.

82. Способ по любому из пп. 69-81, в котором стадия (с) включает выращивание ТП с получением первой популяции, и второе размножение на стадии (d) включает быстрое размножение.

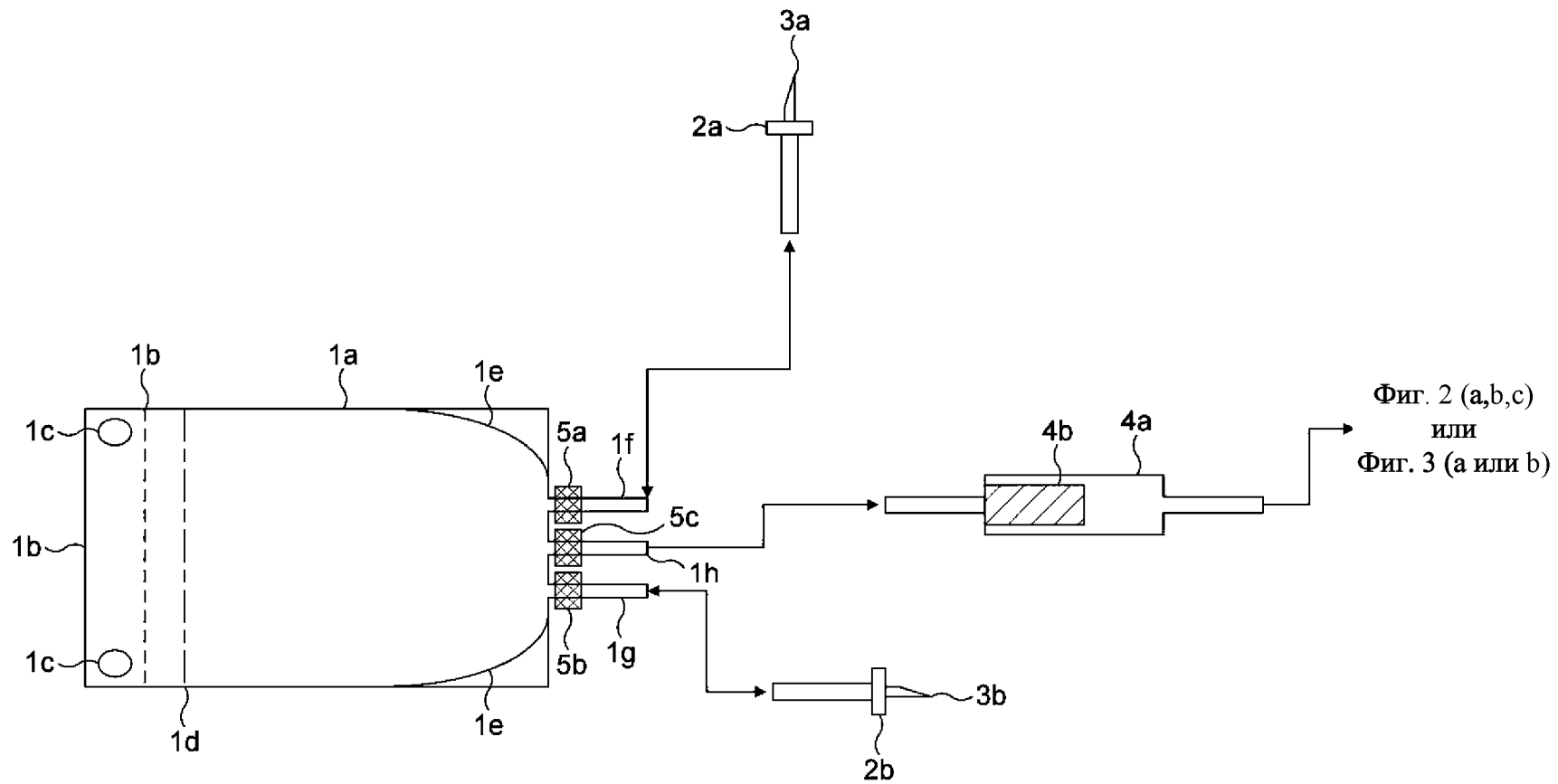
83. Способ по любому из пп. 69-82, в котором стадию (с) проводят в течение примерно двух недель, и стадию (d) проводят в течение примерно двух недель.

84. Способ по любому из пп. 69-83, в котором культивирование на стадии (с) и/или стадии (d) включает добавление П7, П-12, П-15, П-18, П-21 или их комбинации.

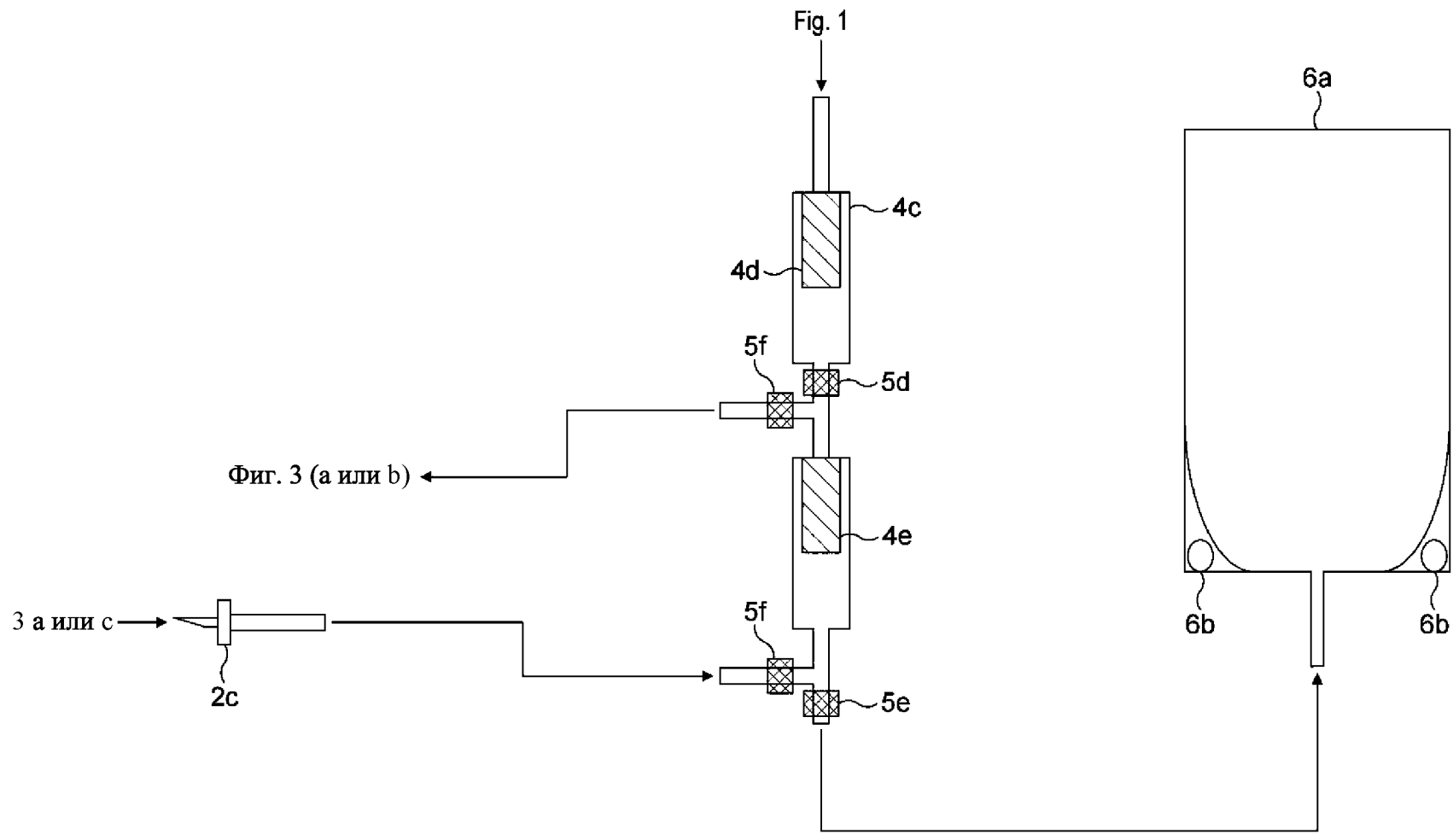
85. Способ по любому из пп. 69-84, включающий помещение резецированной опухолевой ткани в гибкий контейнер с дезагрегационной жидкостью, герметизацию контейнера, физическую и/или ферментативную дезагрегацию опухолевой ткани и криоконсервацию дезагрегированной опухолевой ткани.

86. Способ по любому из пп. 69-85, в котором вторая популяция ТП содержит примерно от 5×10^9 до 5×10^{10} Т-клеток.

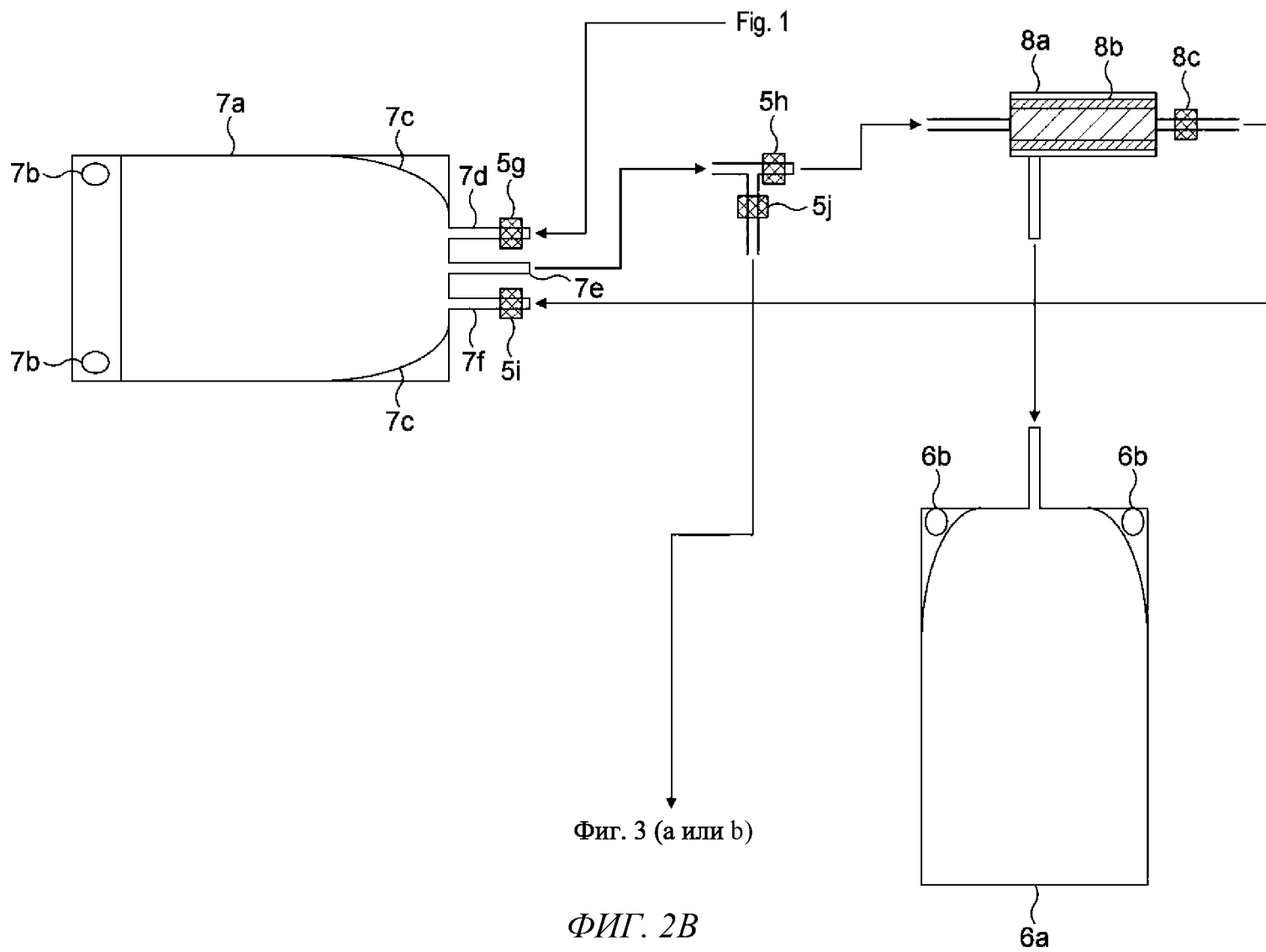
87. Способ по любому из пп. 69-86, в котором рак представляет собой рак мочевого пузыря, рак молочной железы, рак, вызванный вирусом папилломы человека, рак шейки матки, рак головы и шеи (включая плоскоклеточный рак головы и шеи (HNSCC), рак легких, меланому, рак яичников, немелкоклеточный рак легкого (NSCLC), рак почки или почечно-клеточную карциному.

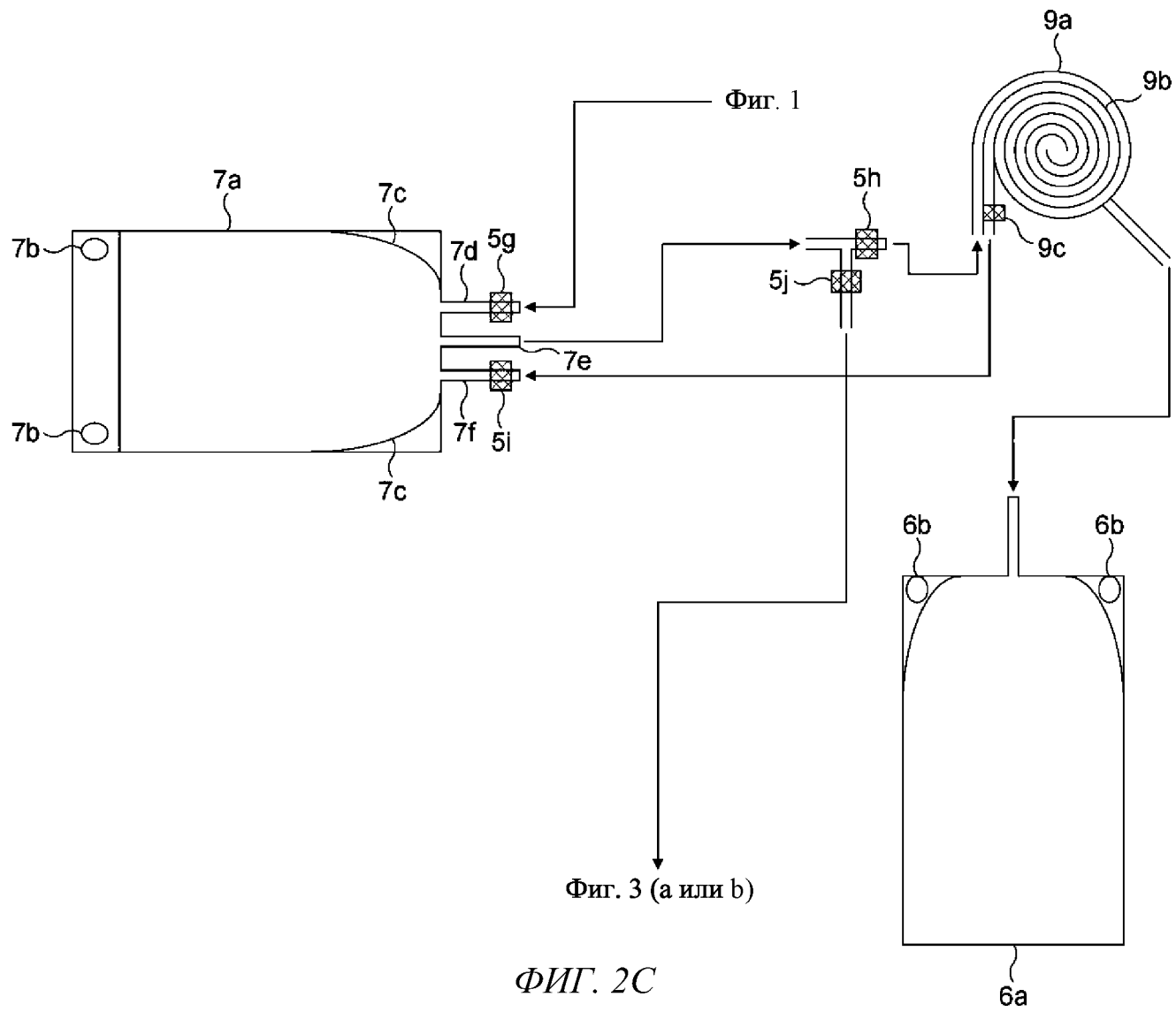


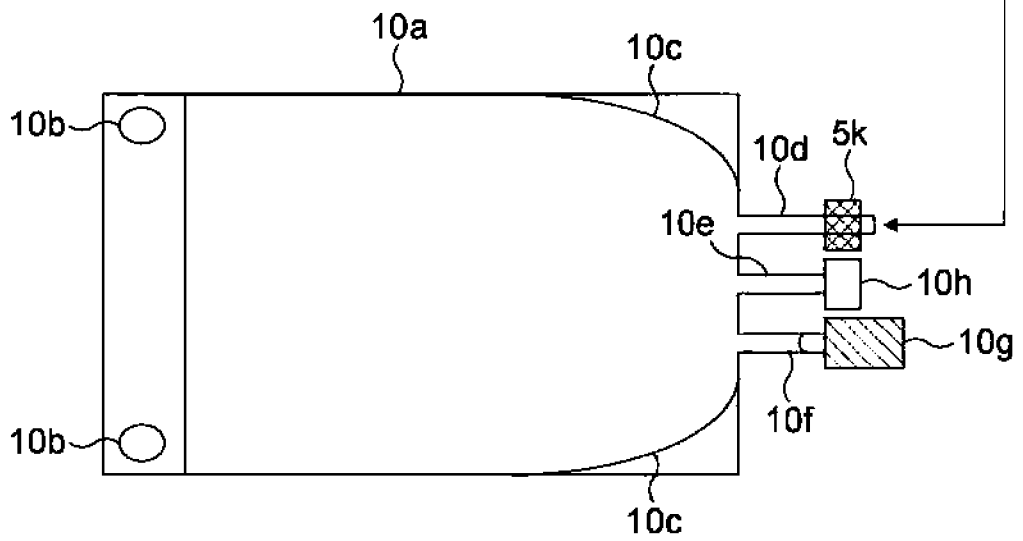
ФИГ. 1



ФИГ. 2А

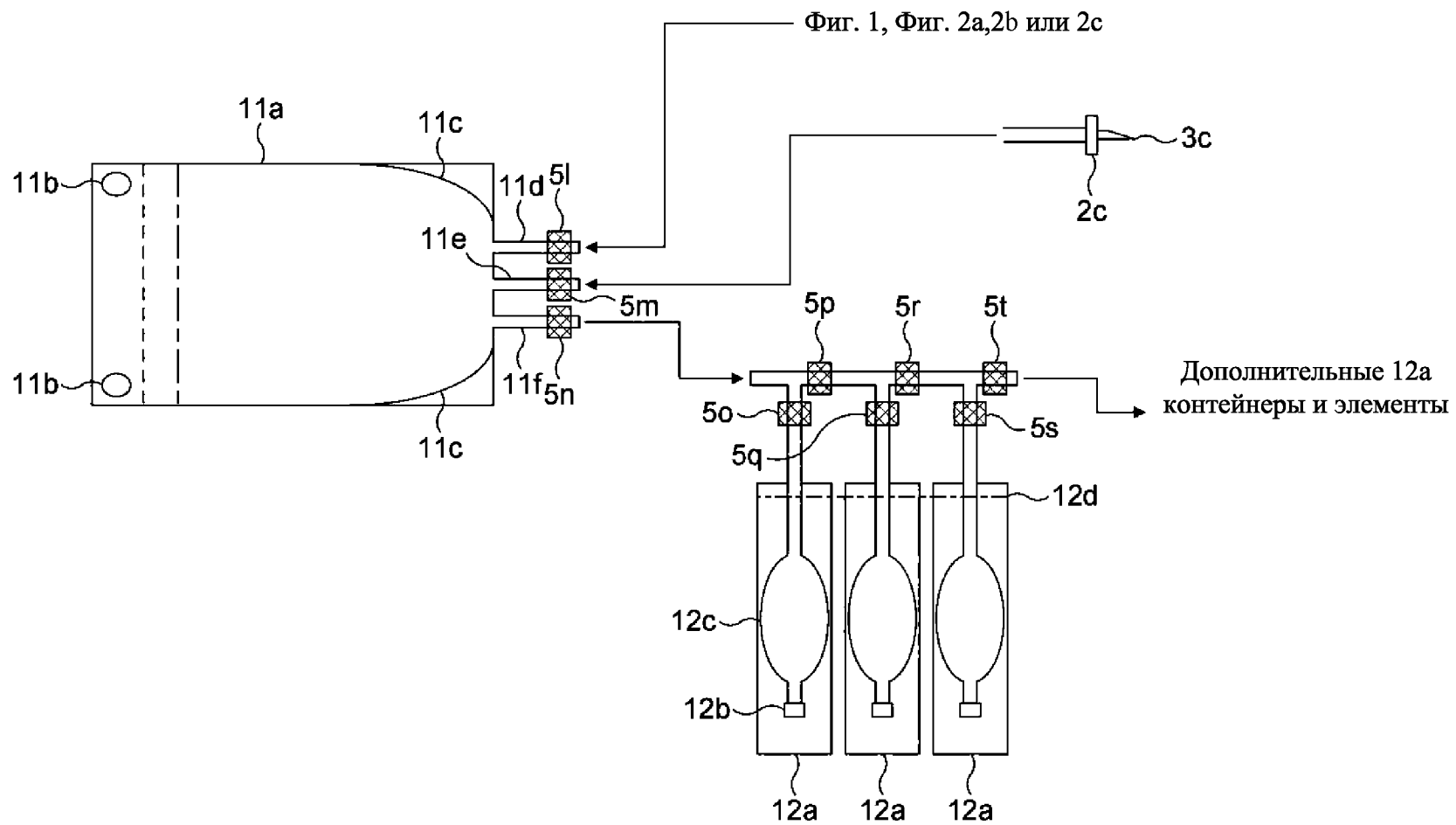




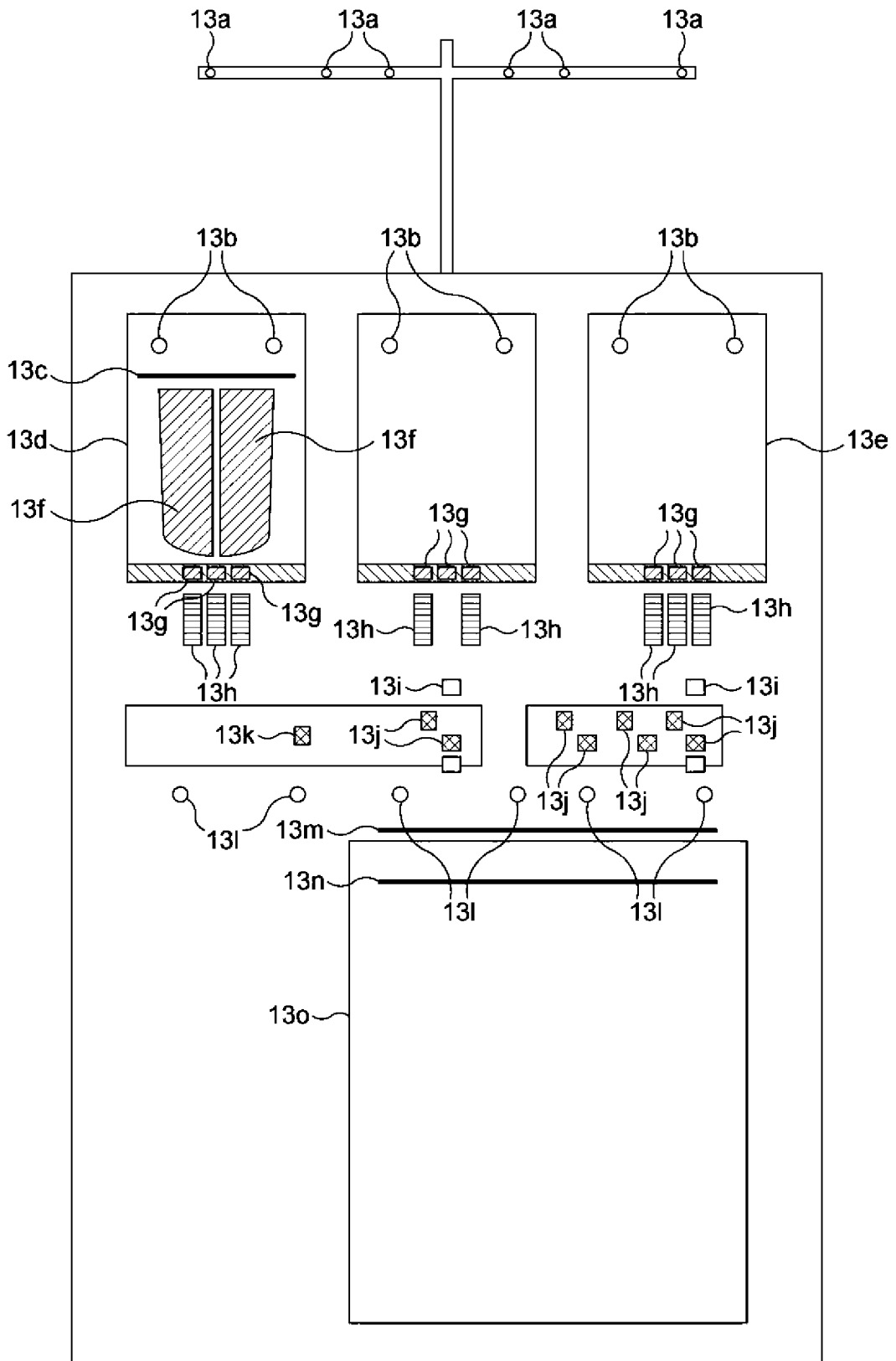


Фиг. 1, Фиг. 2а, 2b или 2с

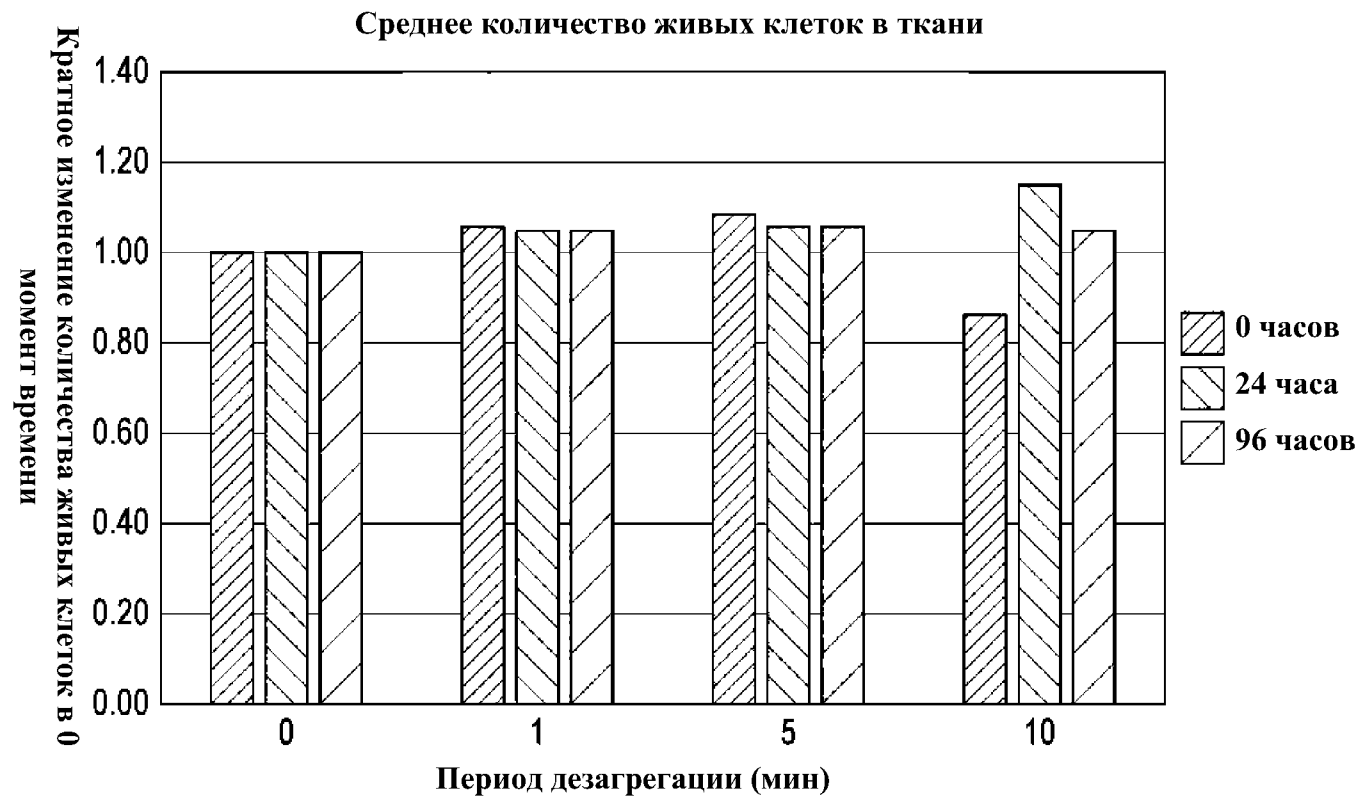
ФИГ. 3А



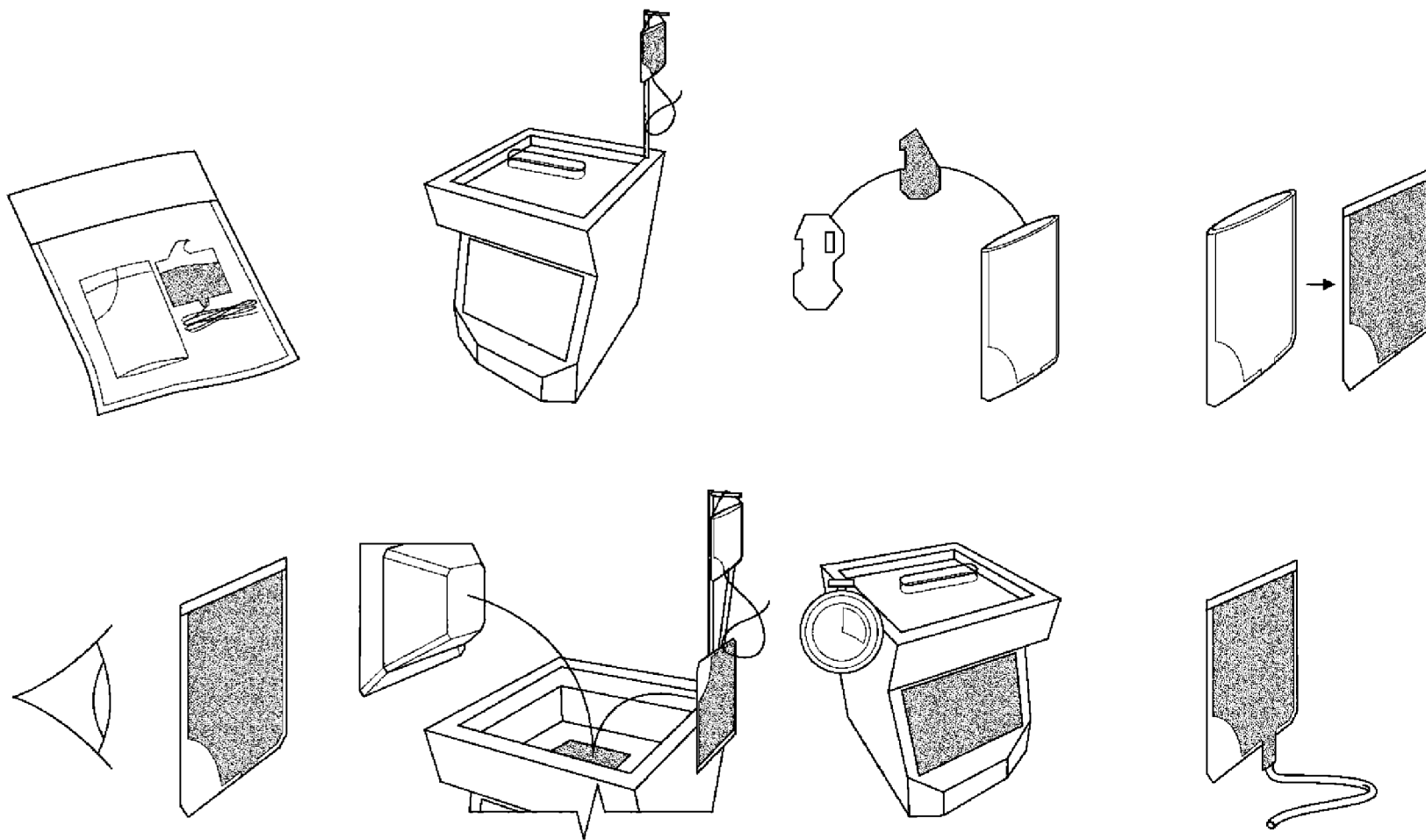
ФИГ. 3В



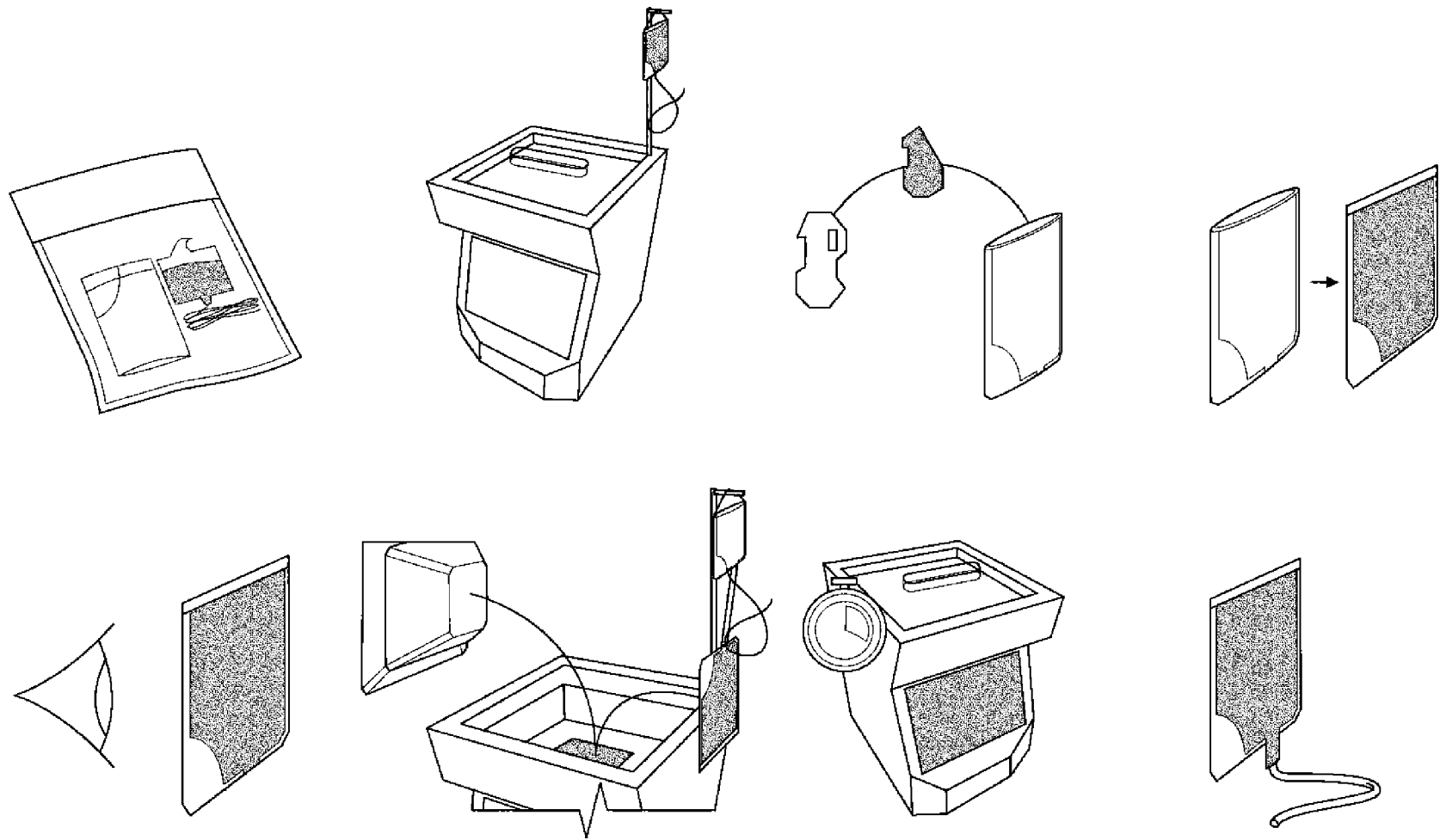
ФИГ. 4



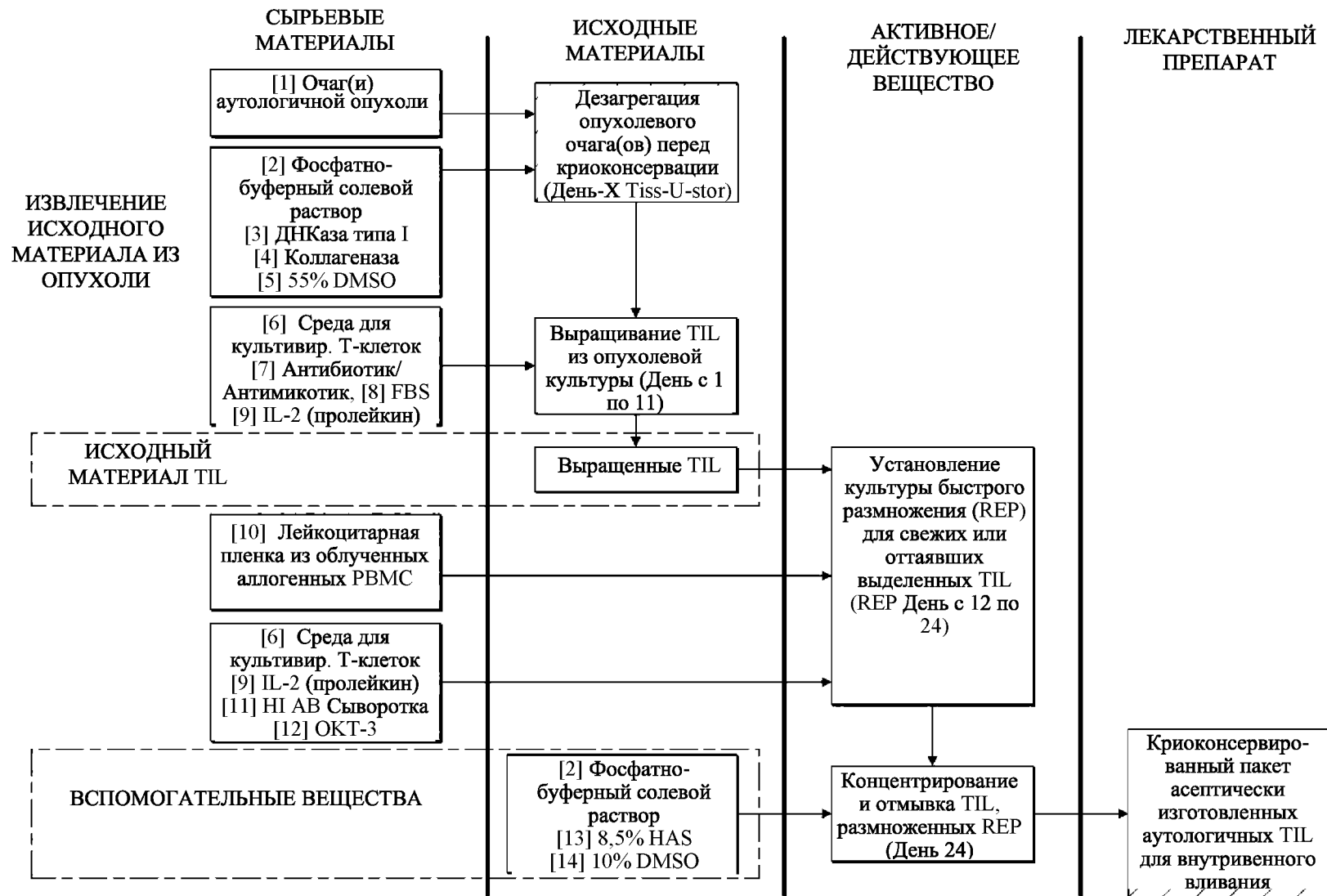
ФИГ. 5



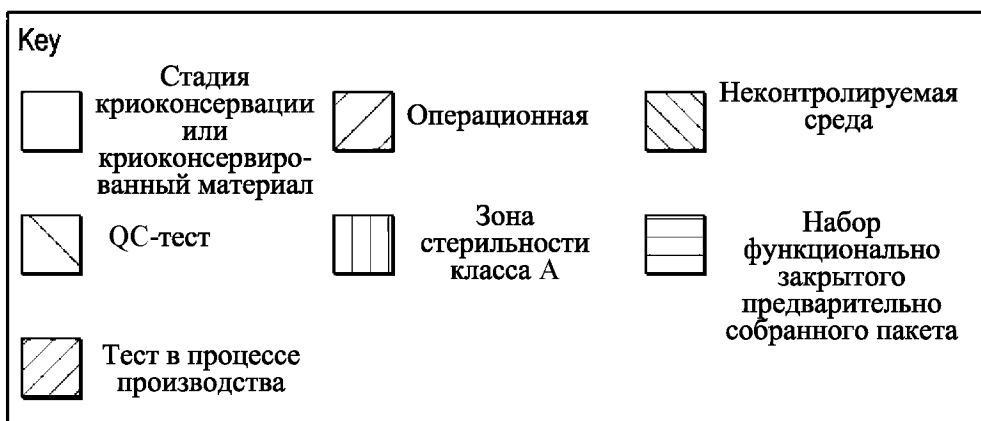
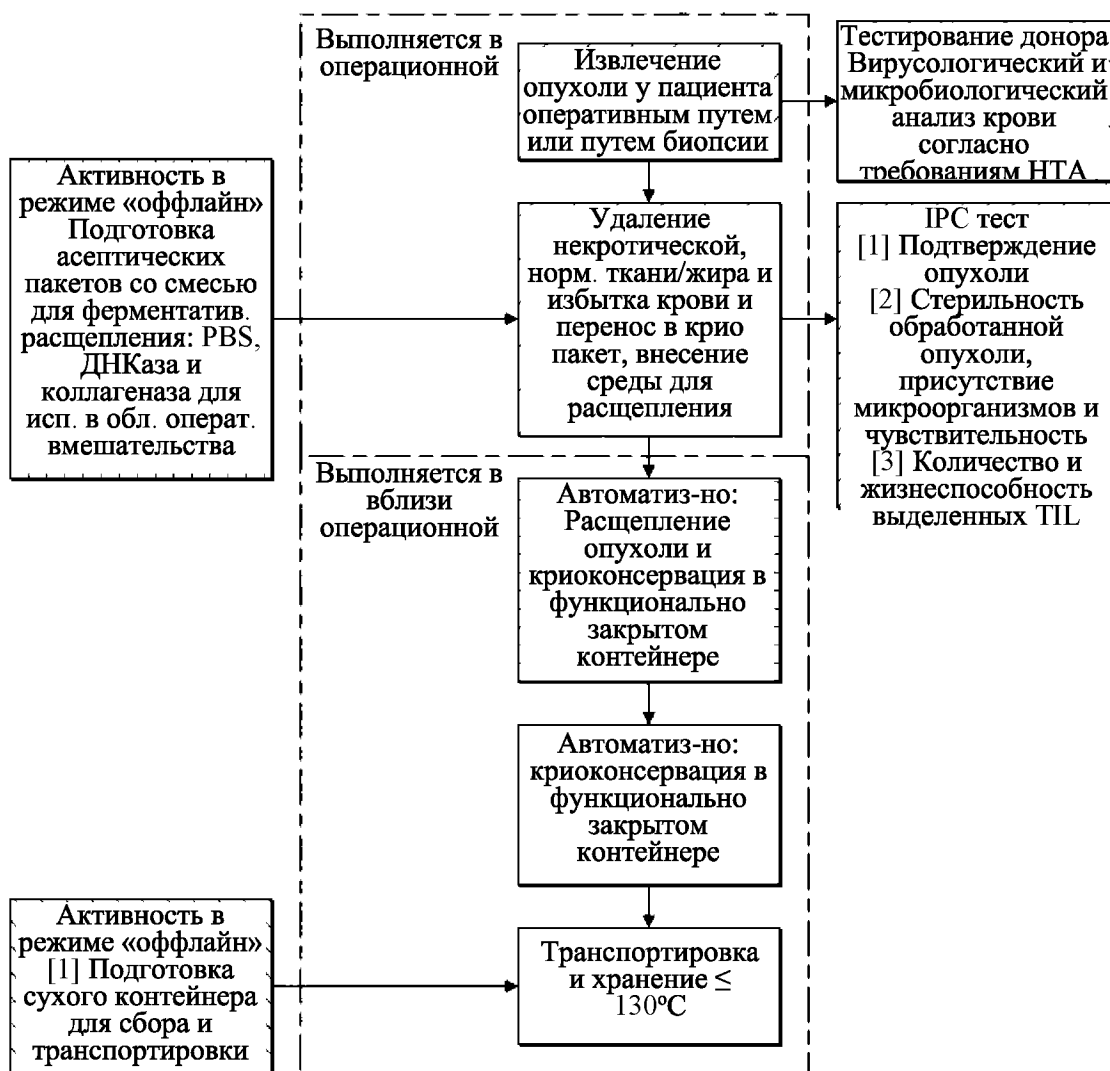
ФИГ. 6



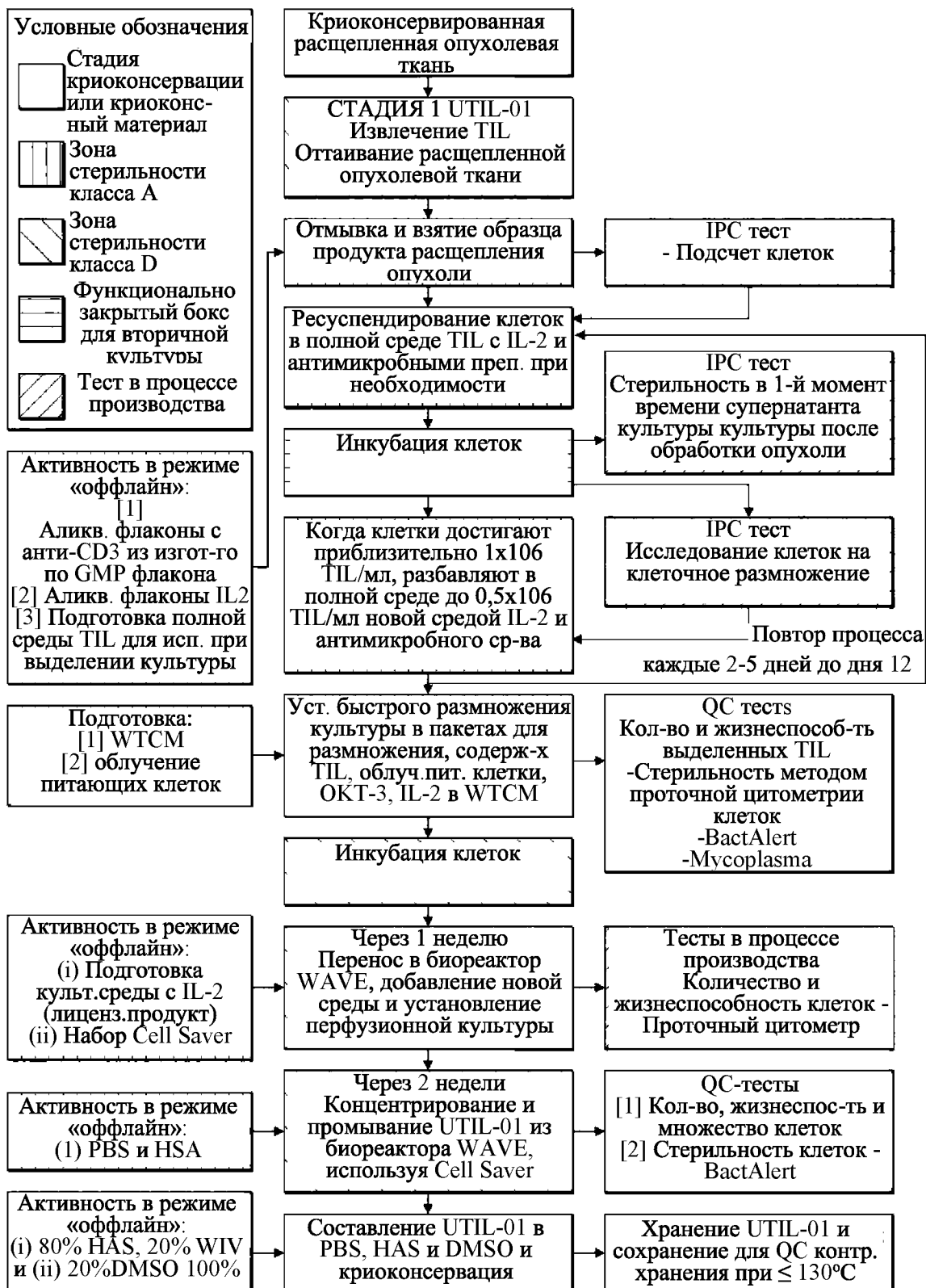
ФИГ. 7



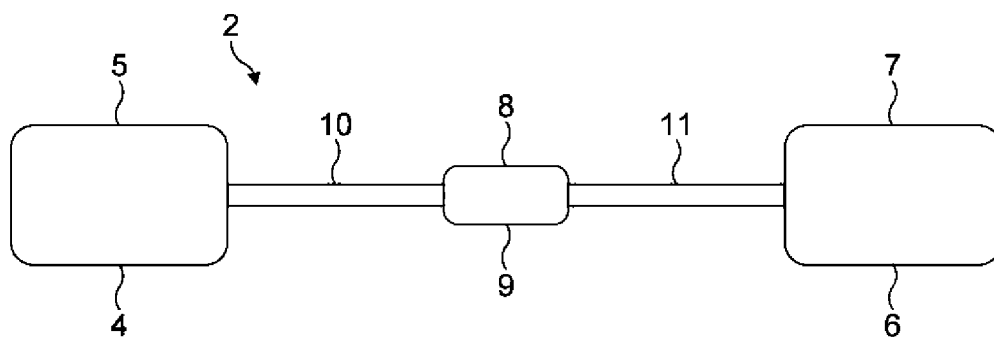
ФИГ. 8



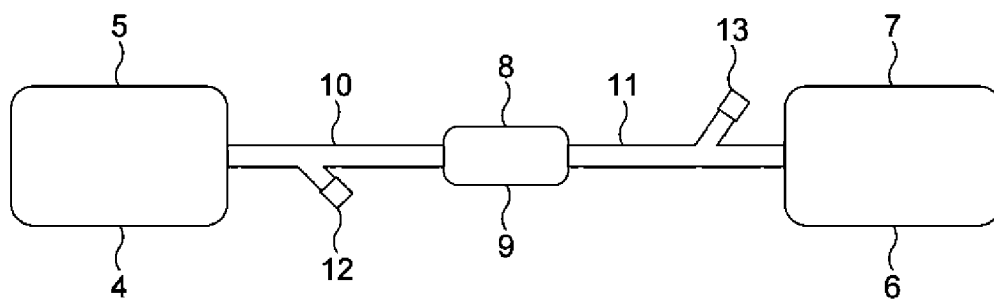
ФИГ. 9



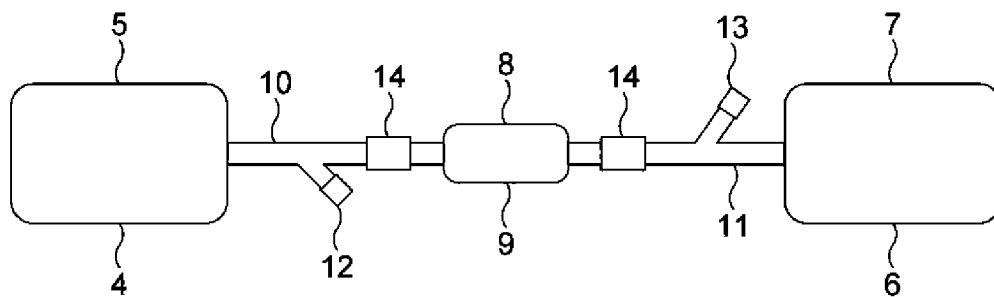
ФИГ. 10



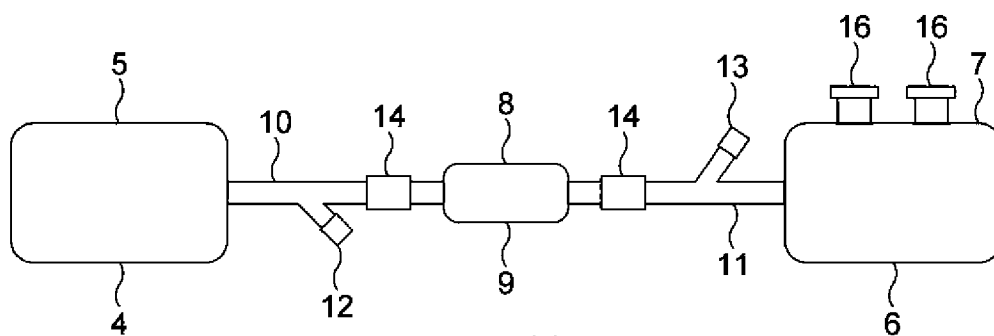
ФИГ. 11А



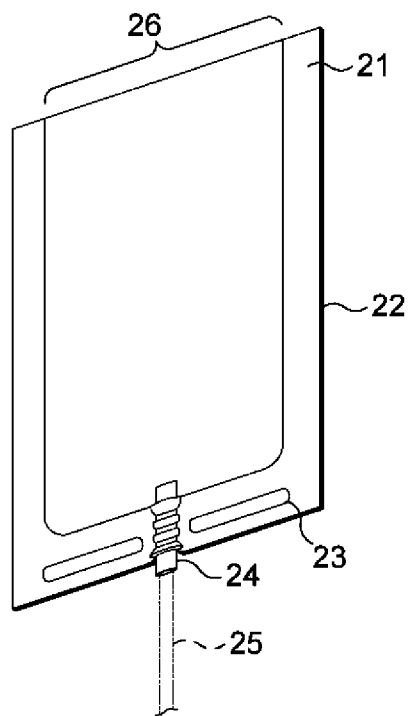
ФИГ. 11В



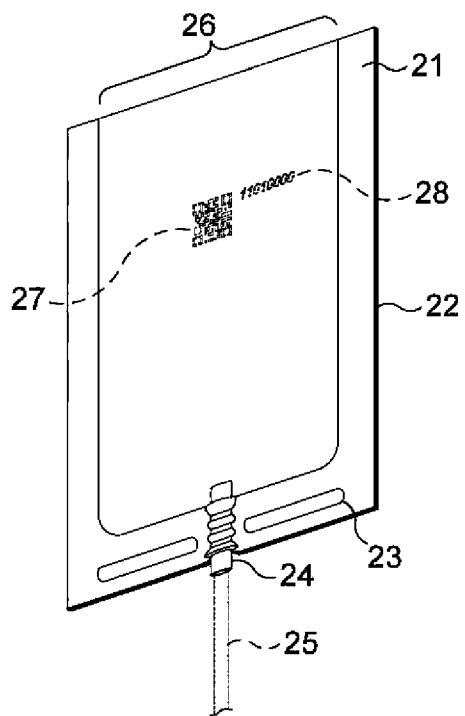
ФИГ. 11С



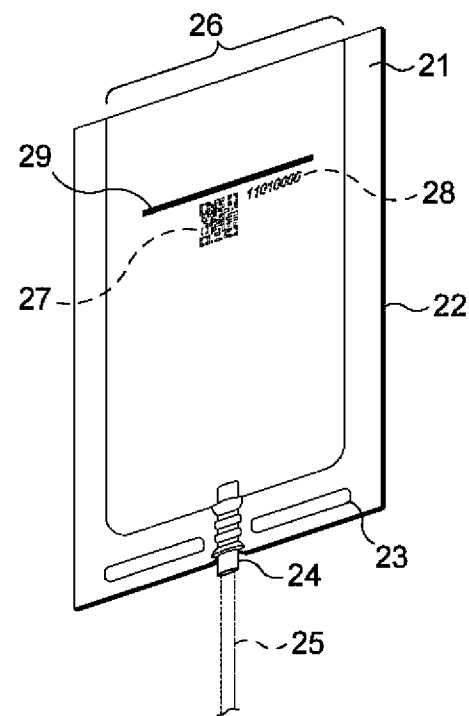
ФИГ. 11D



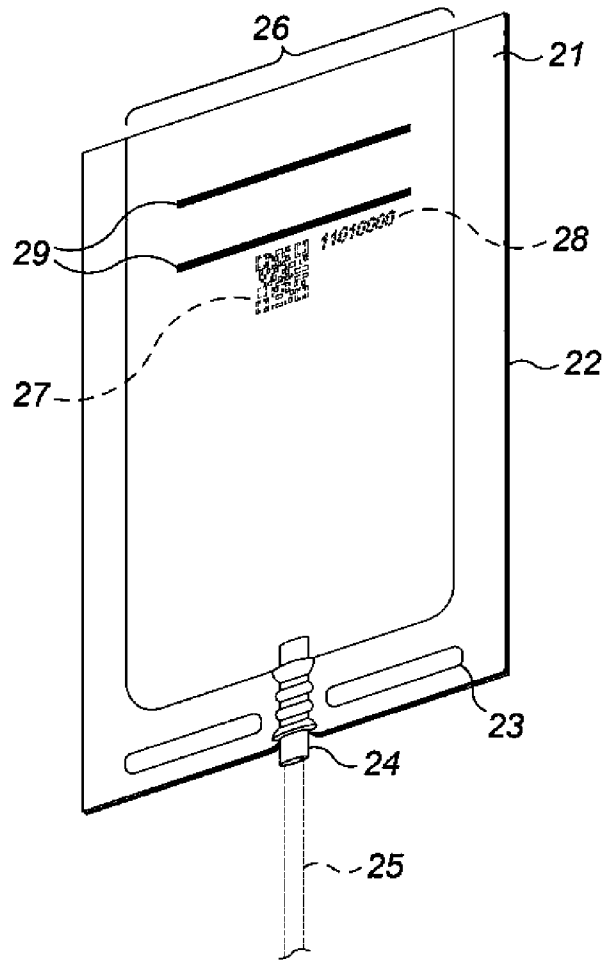
ФИГ. 12А



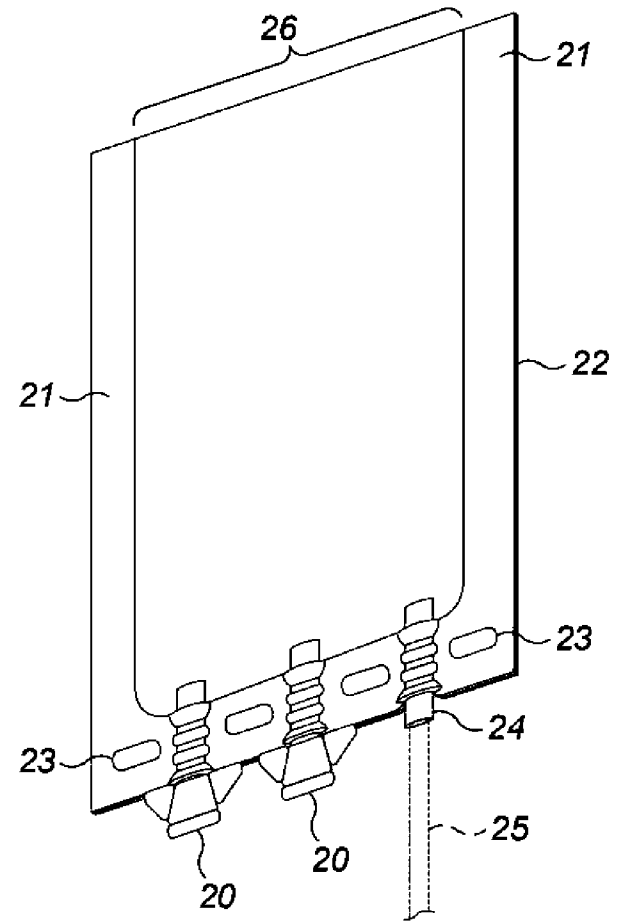
ФИГ. 12В



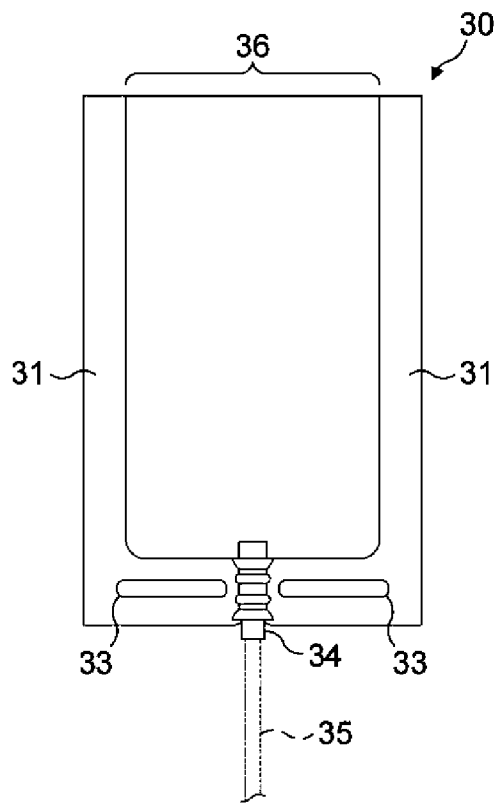
ФИГ. 12С



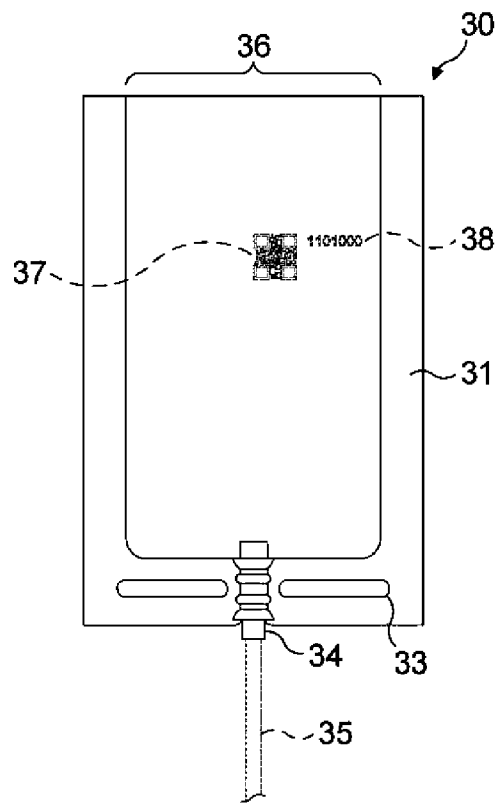
ФИГ. 12D



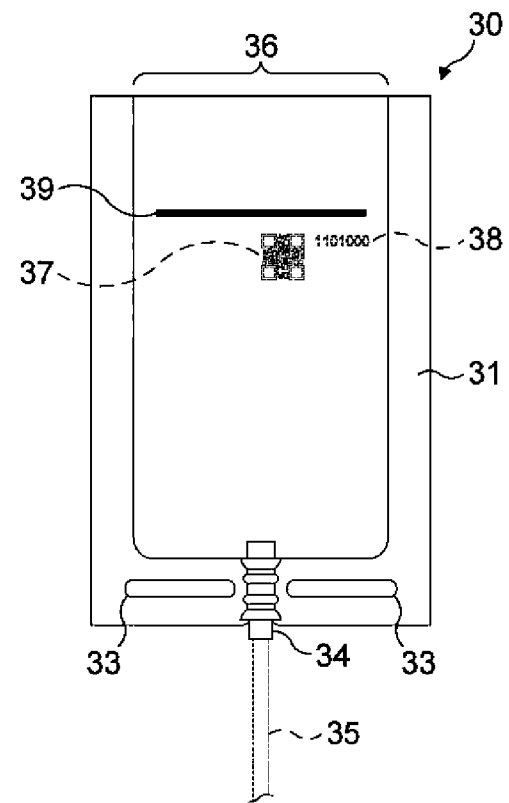
ФИГ. 12E



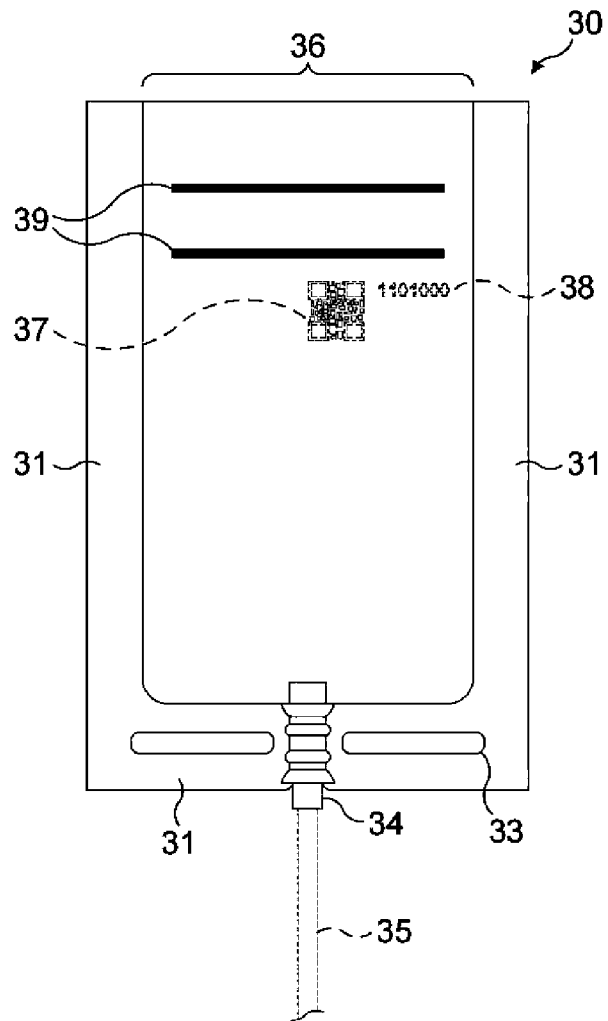
ФИГ. 13А



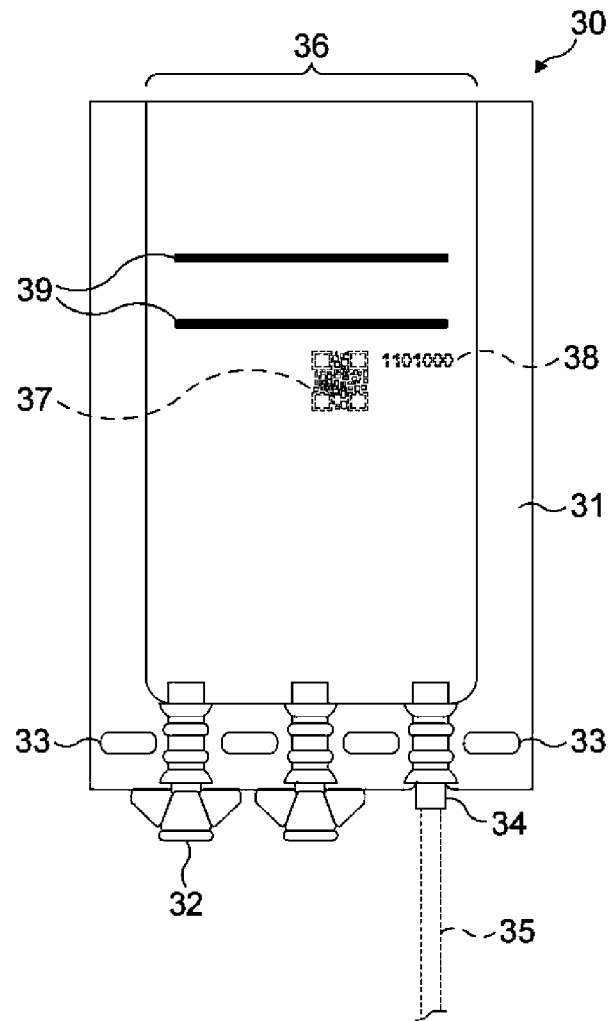
ФИГ. 13В



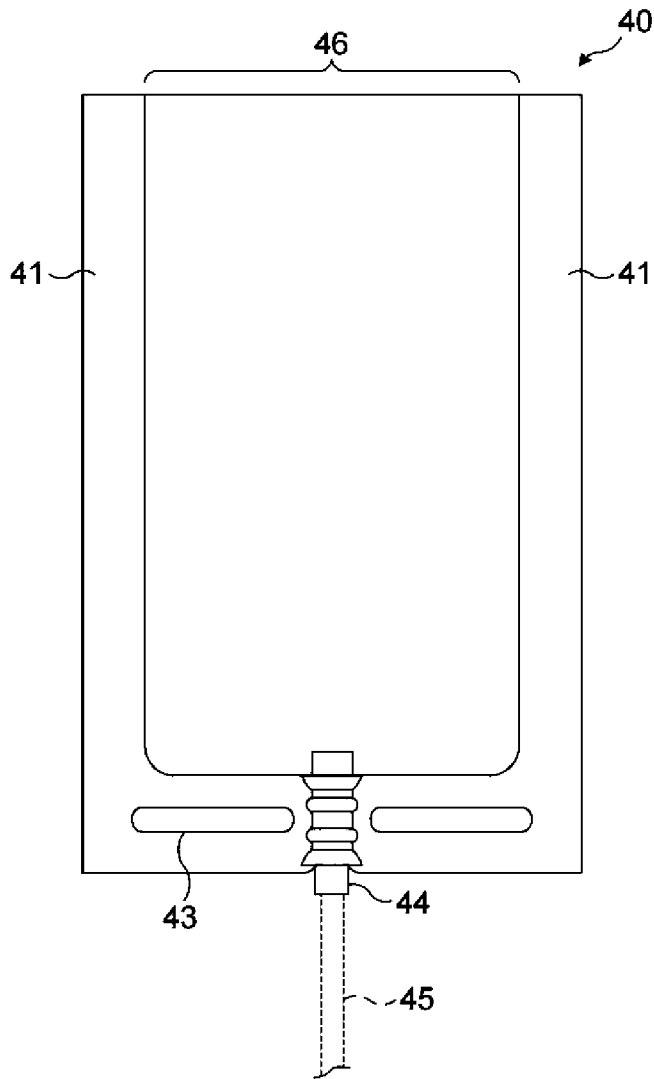
ФИГ. 13С



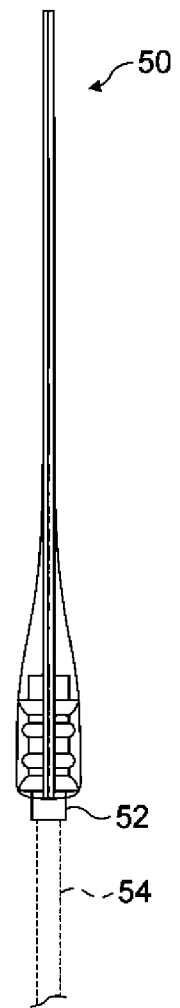
ФИГ. 13D



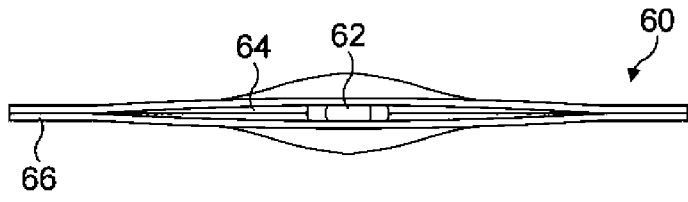
ФИГ. 13E



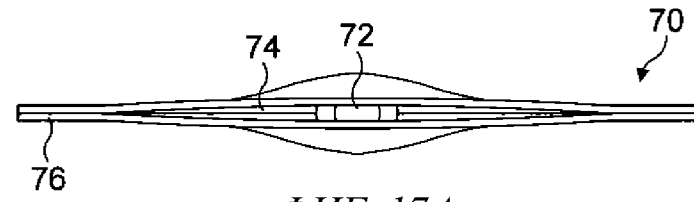
ФИГ. 14



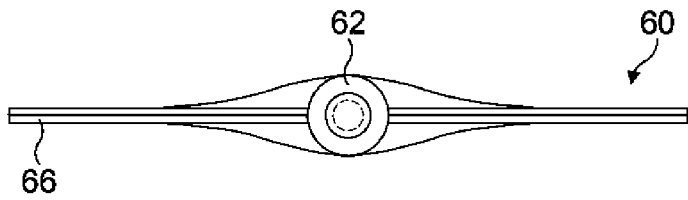
ФИГ. 15



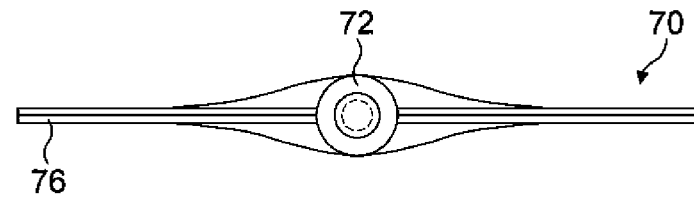
ФИГ. 16А



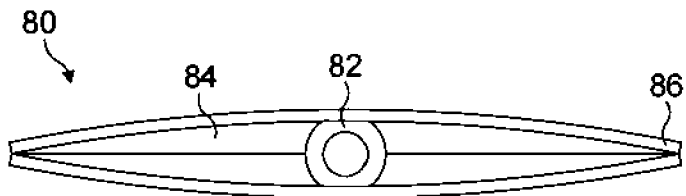
ФИГ. 17А



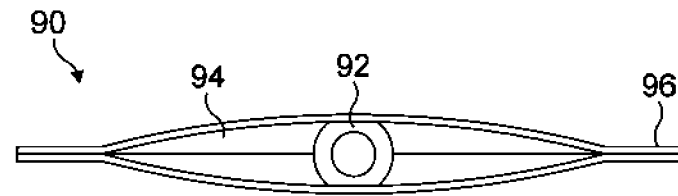
ФИГ. 16В



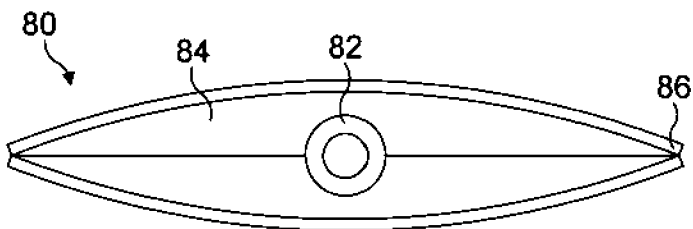
ФИГ. 17В



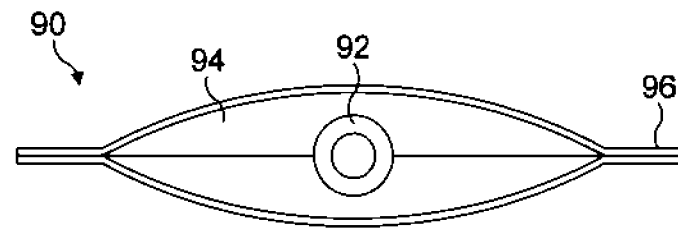
ФИГ. 18А



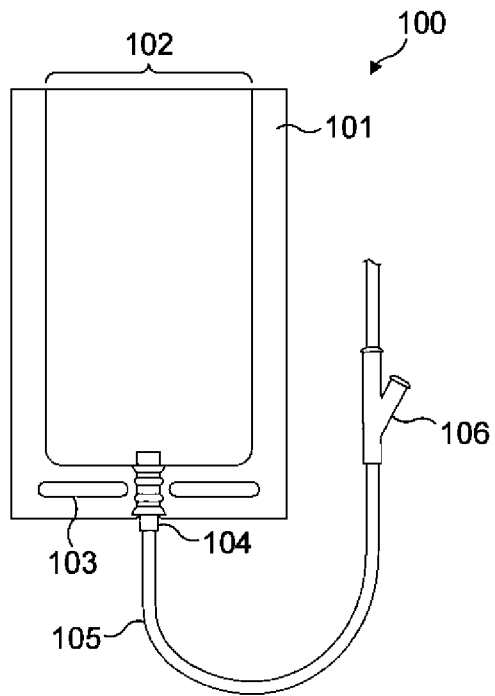
ФИГ. 19А



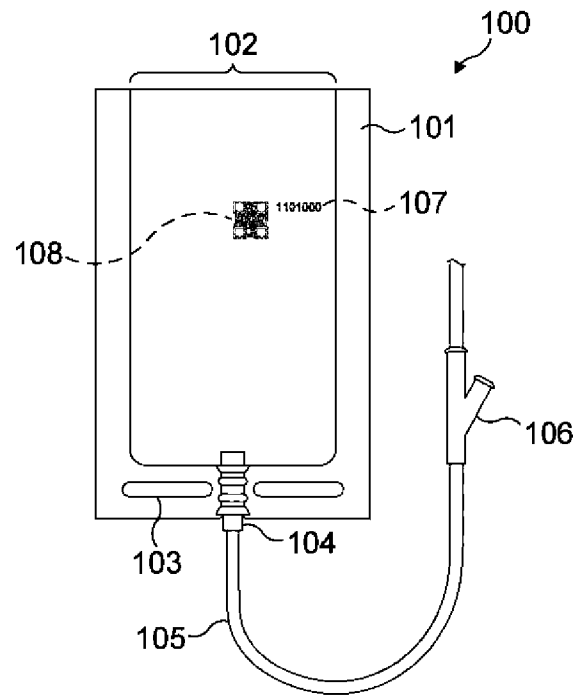
ФИГ. 18В



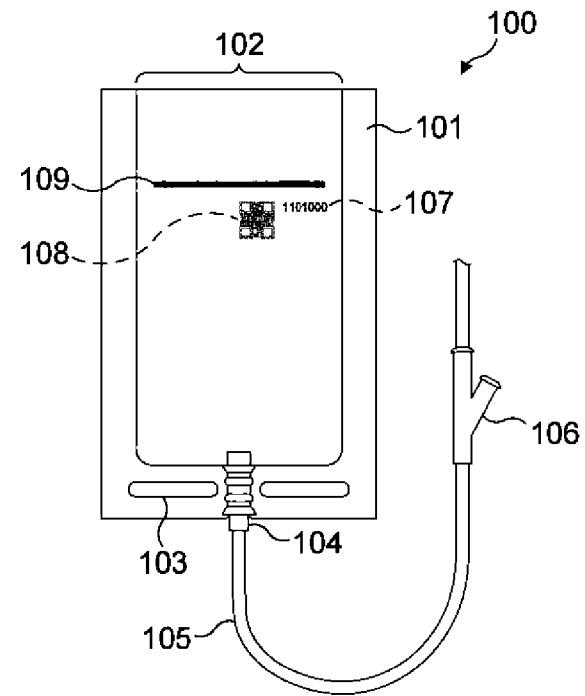
ФИГ. 19В



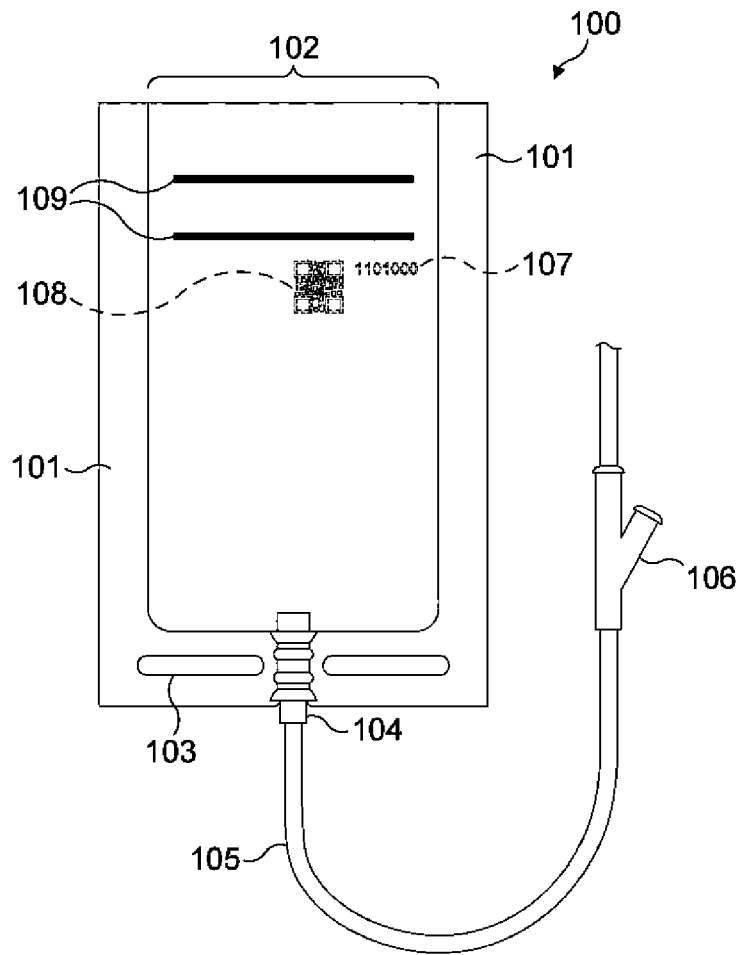
ФИГ. 20А



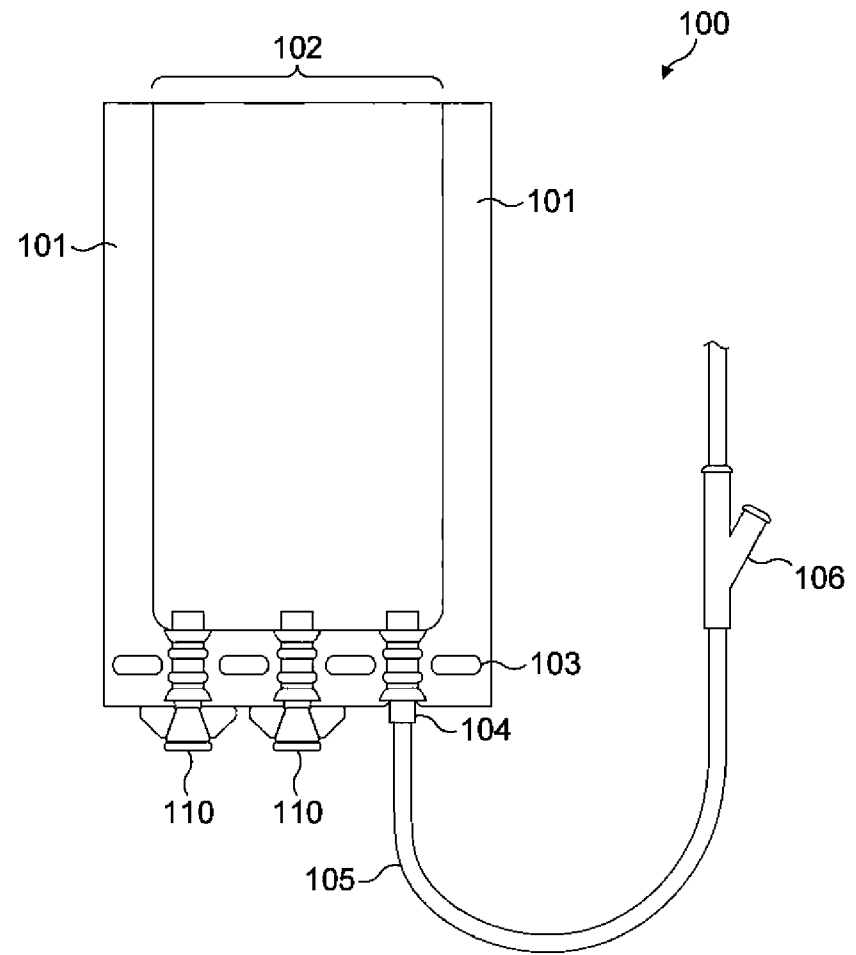
ФИГ. 20В



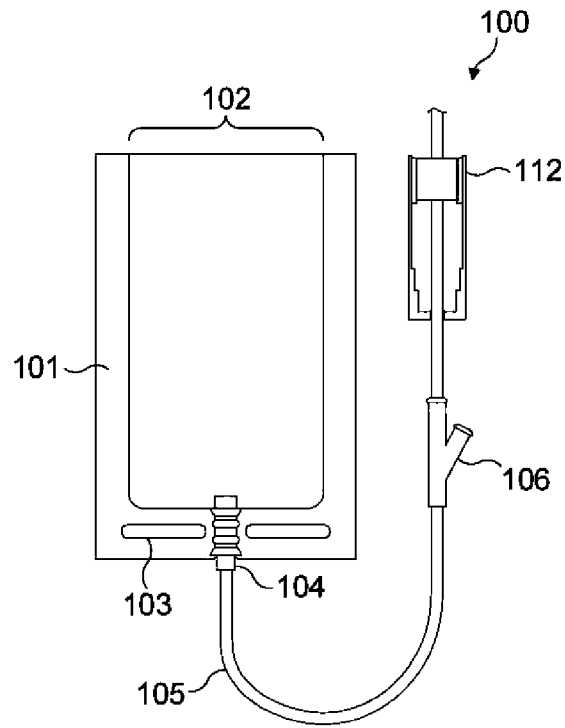
ФИГ. 20С



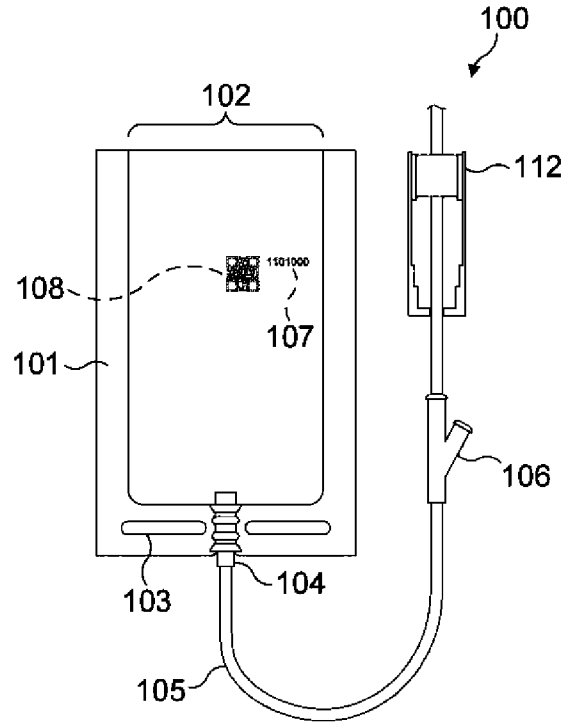
ФИГ. 20D



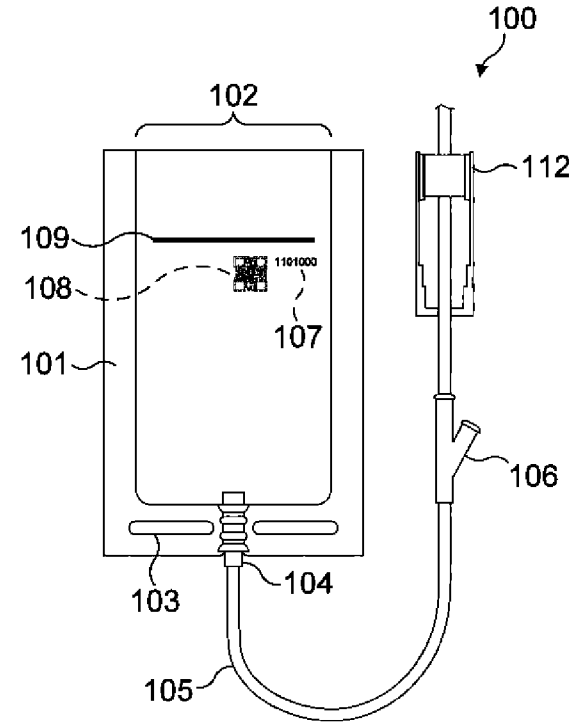
ФИГ. 20E



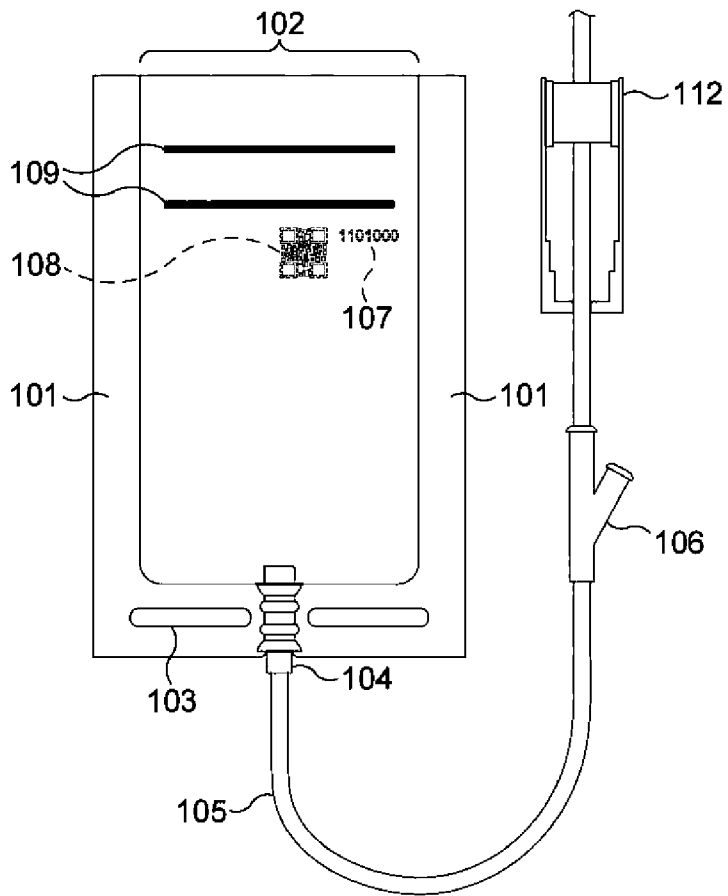
ФИГ. 21А



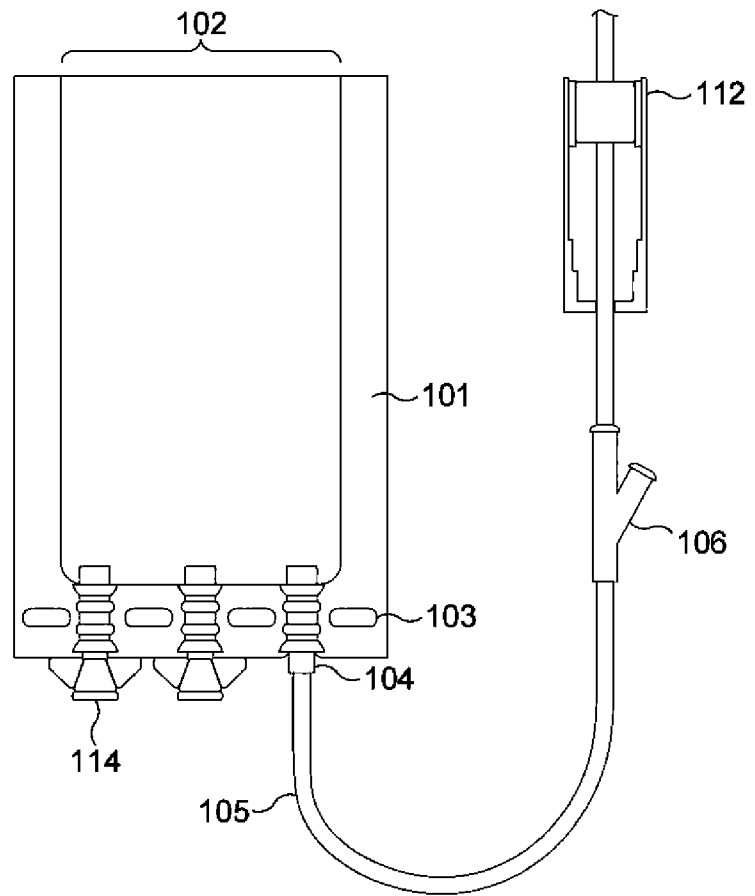
ФИГ. 21В



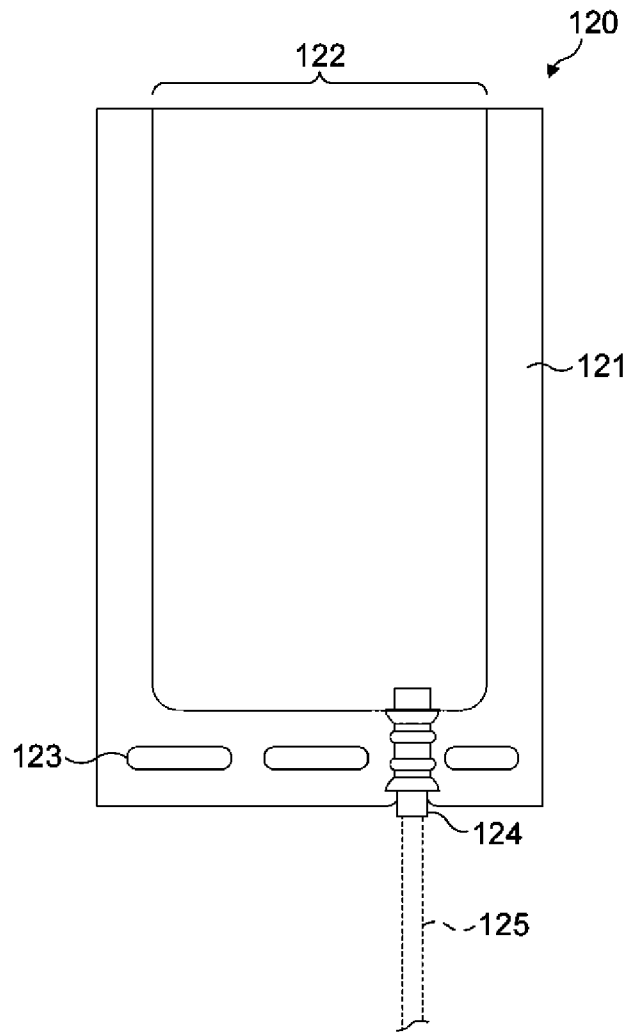
ФИГ. 21С



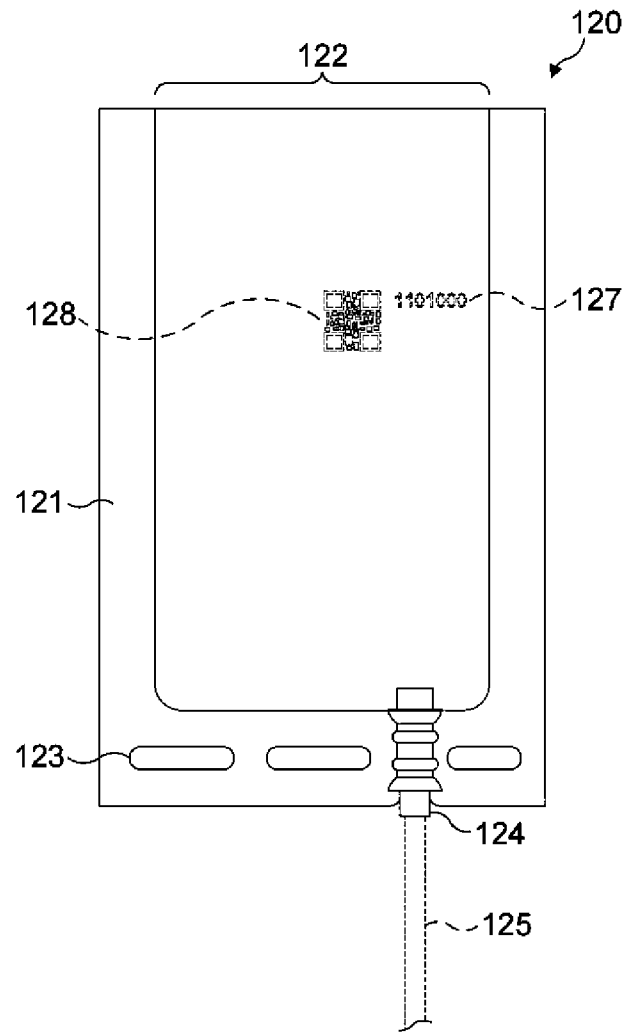
ФИГ. 21D



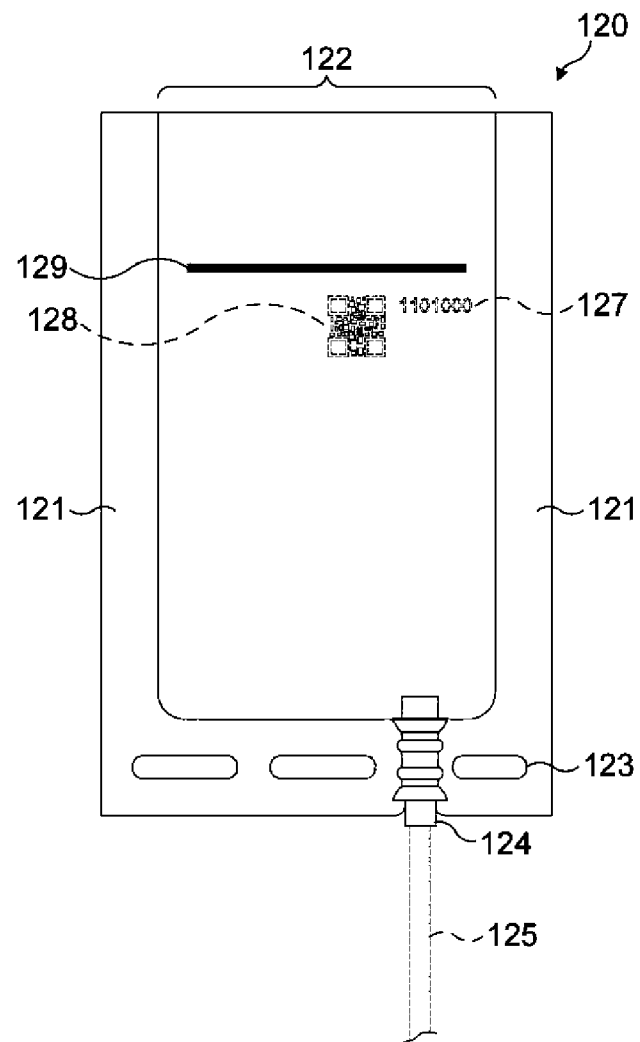
ФИГ. 21E



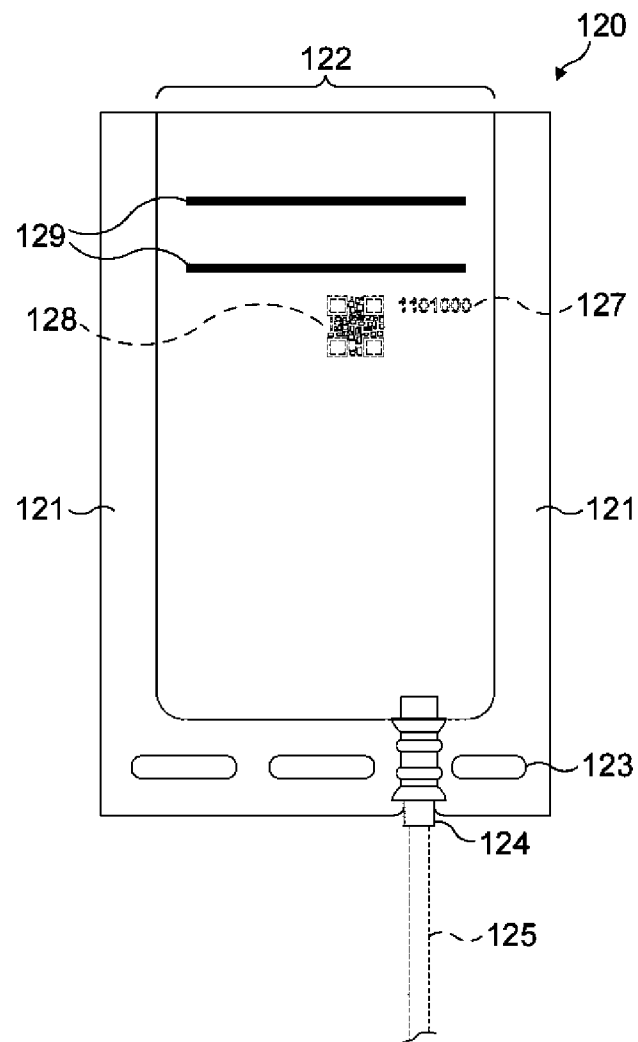
ФИГ. 22А



ФИГ. 22В

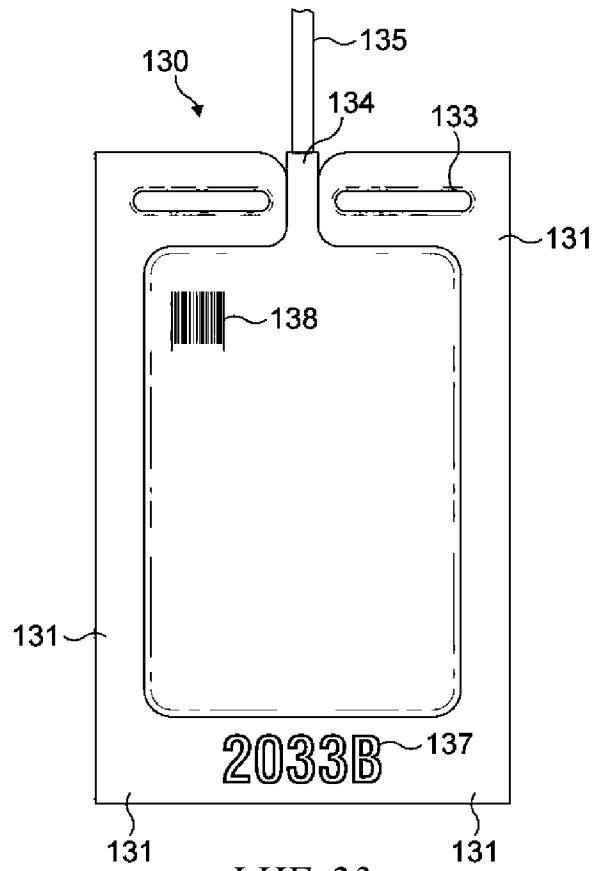


ФИГ. 22С

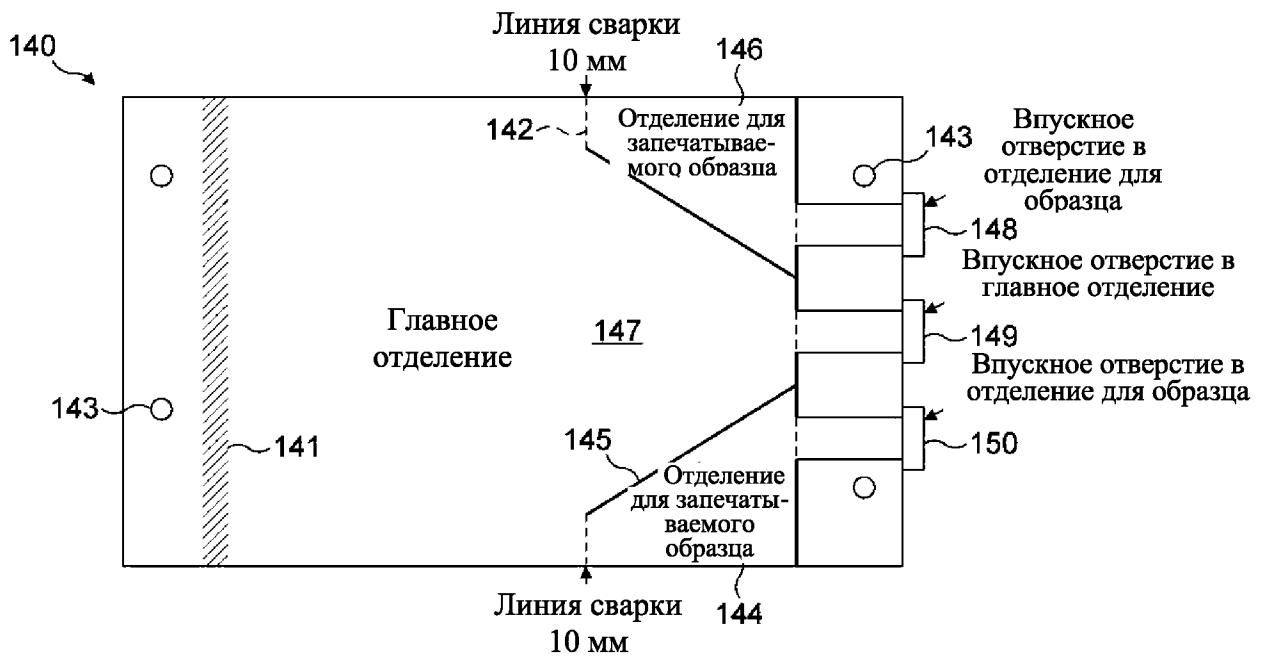


ФИГ. 22D

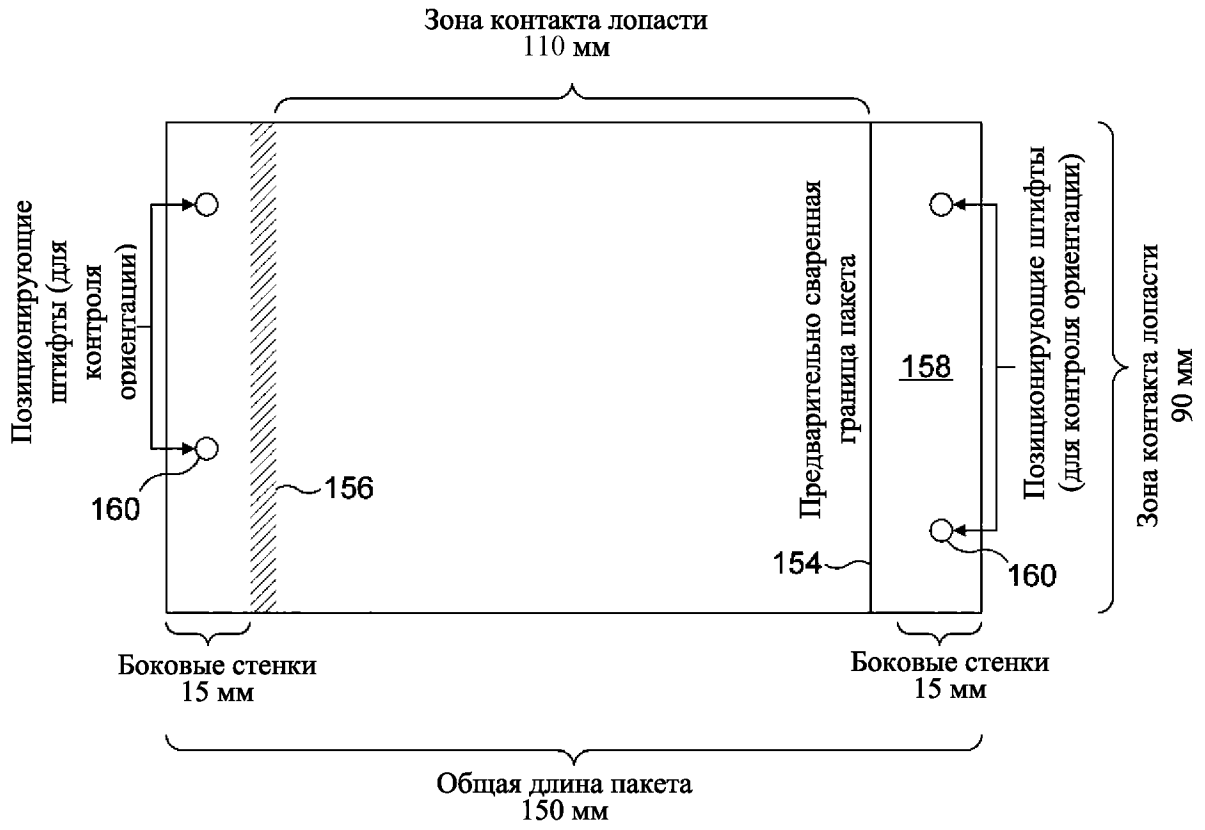
28 / 67



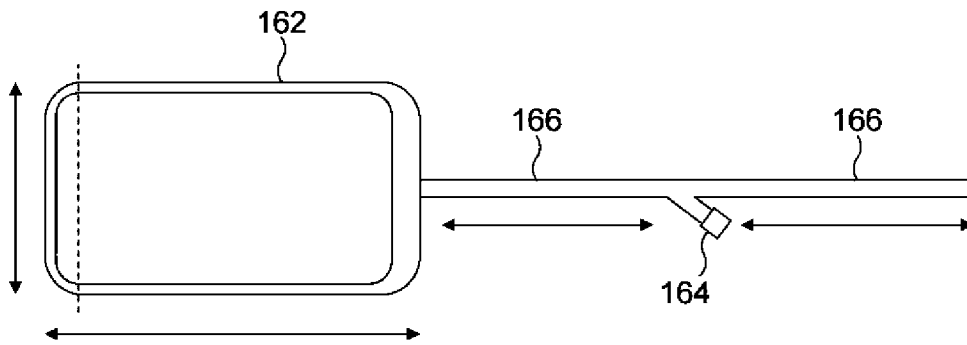
ФИГ. 23



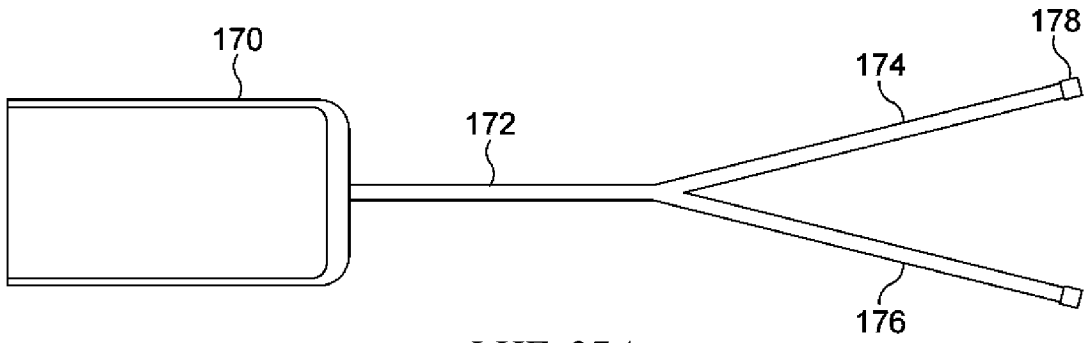
ФИГ. 24



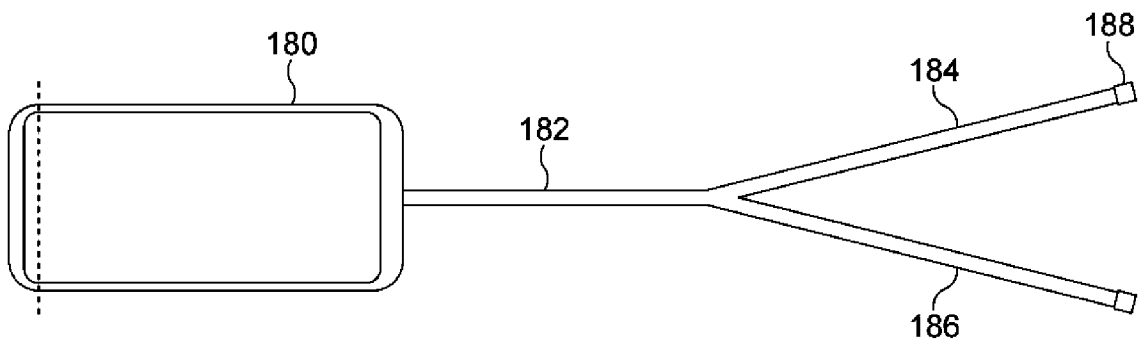
ФИГ. 25



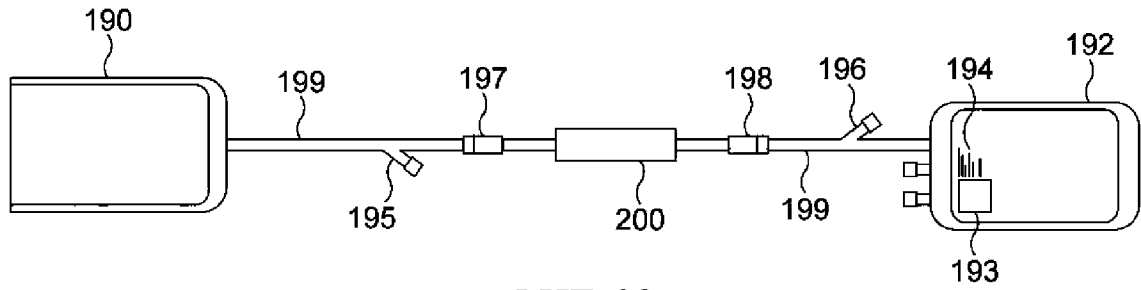
ФИГ. 26



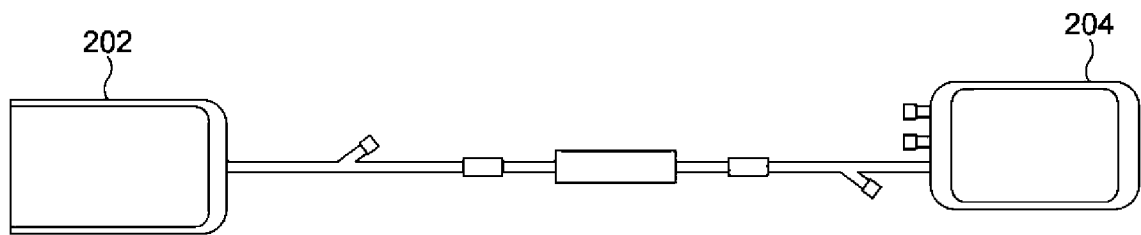
ФИГ. 27А



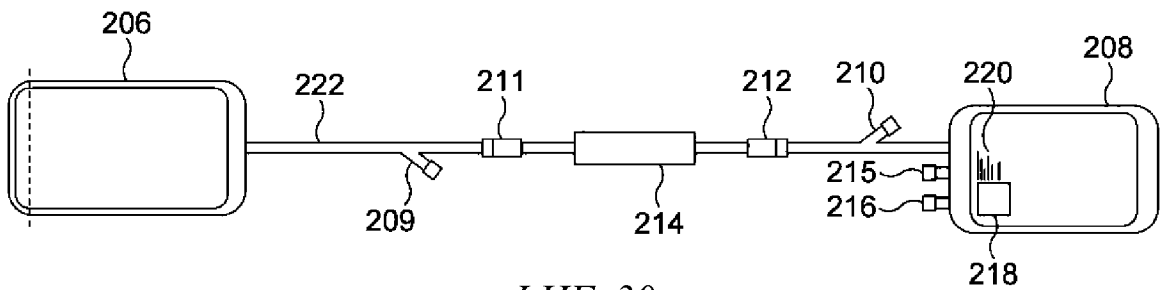
ФИГ. 27В



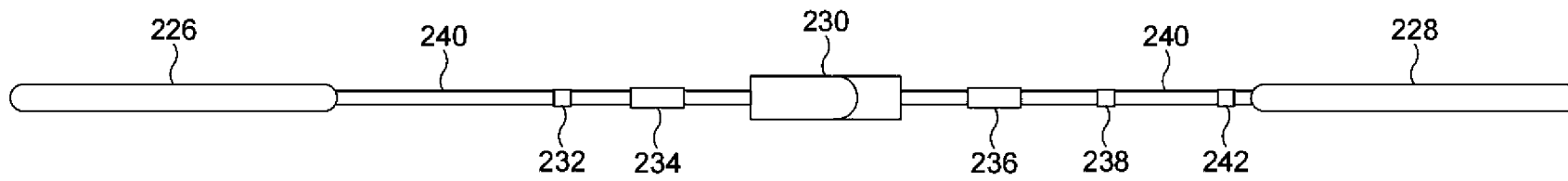
ФИГ. 28



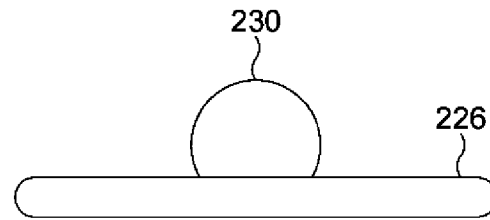
ФИГ. 29



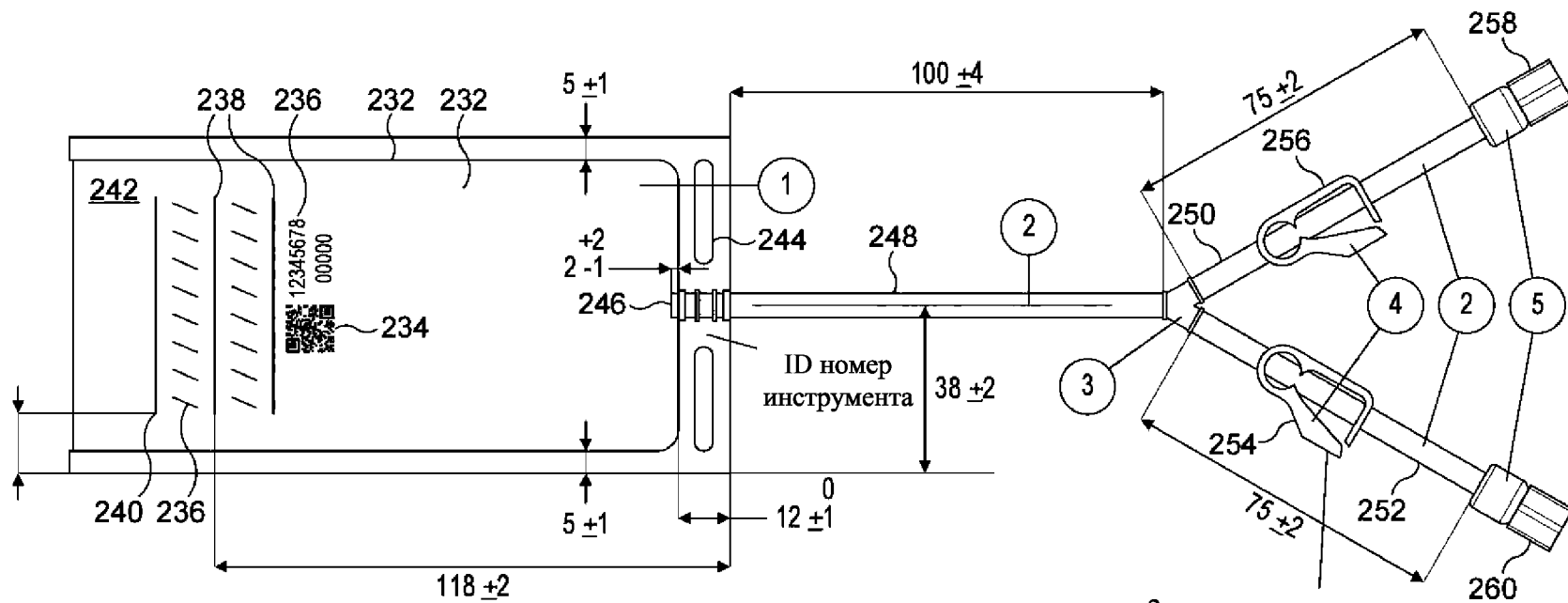
ФИГ. 30



ФИГ. 31

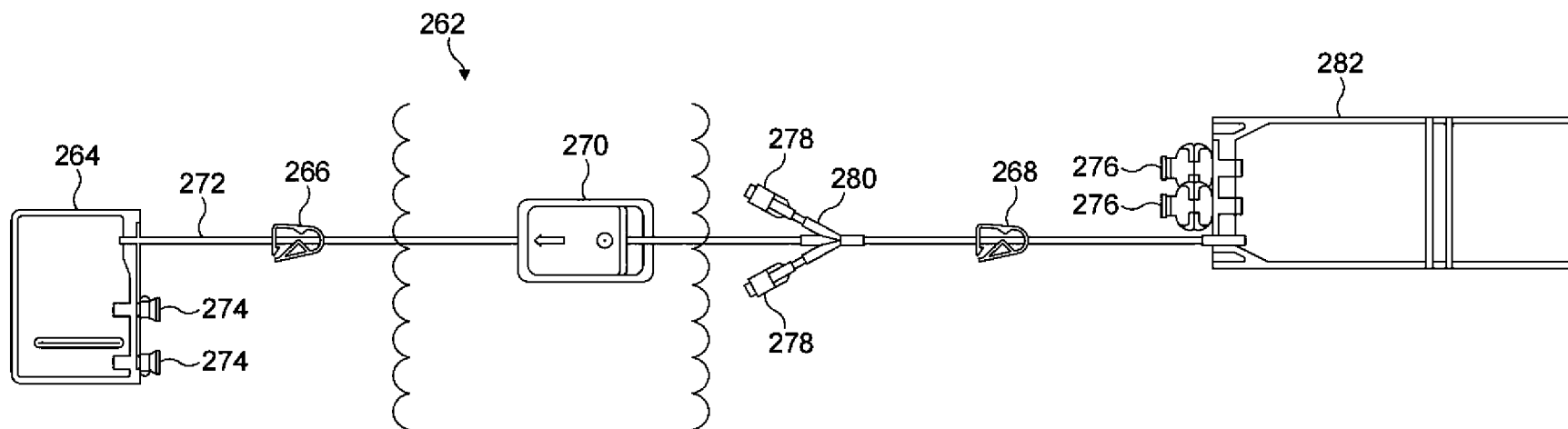


ФИГ. 32

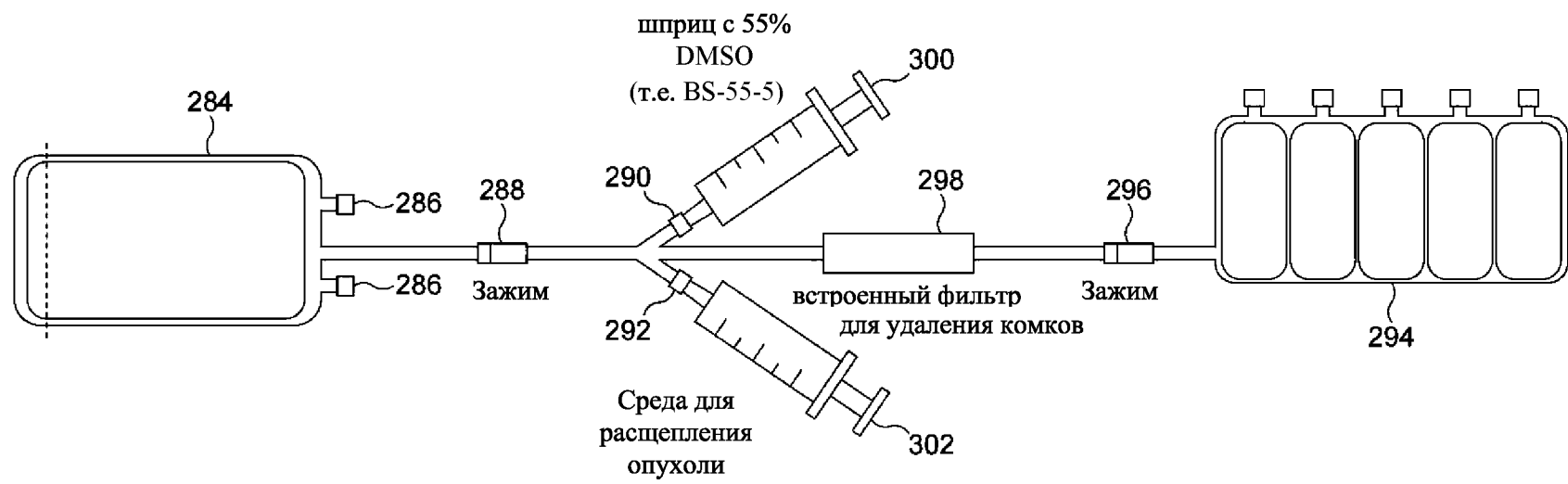


ФИГ. 33

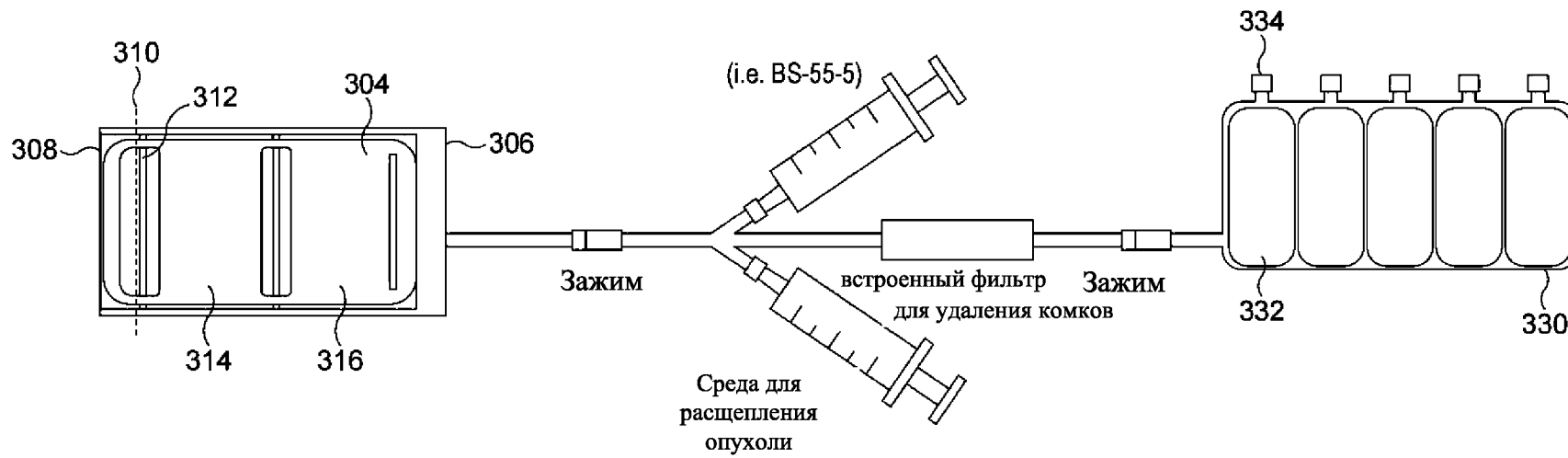
2х зажима должны
оставаться открытыми



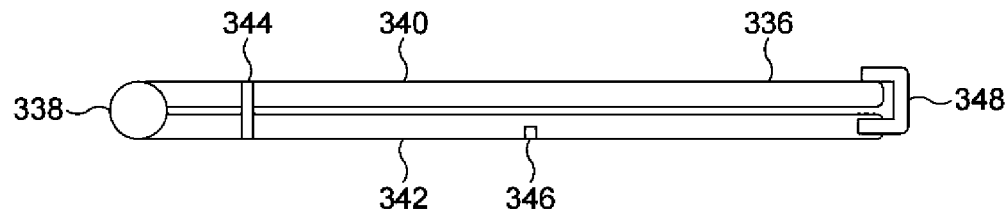
ФИГ. 34



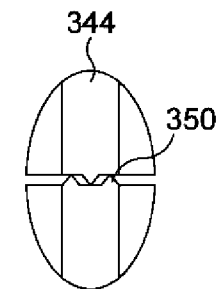
ФИГ. 35



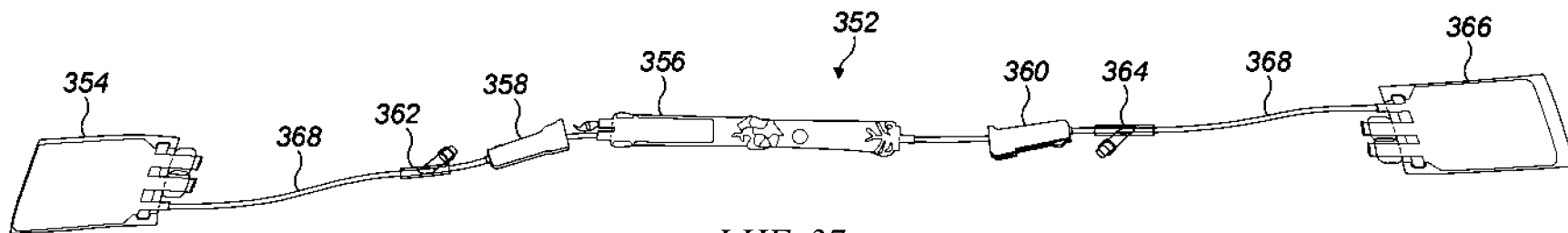
ФИГ. 36А



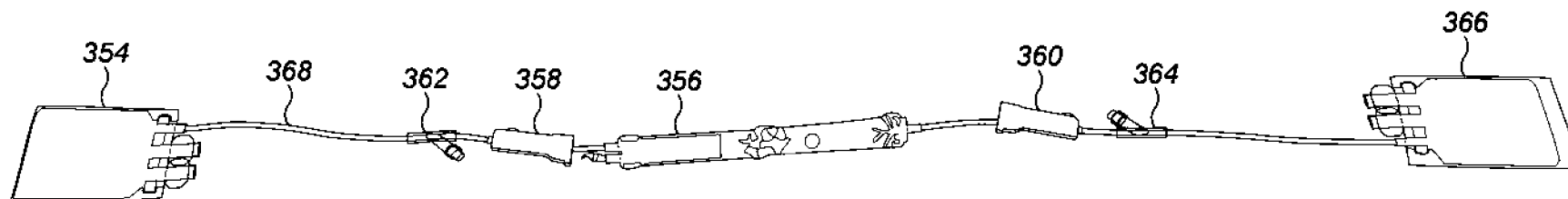
ФИГ. 36В



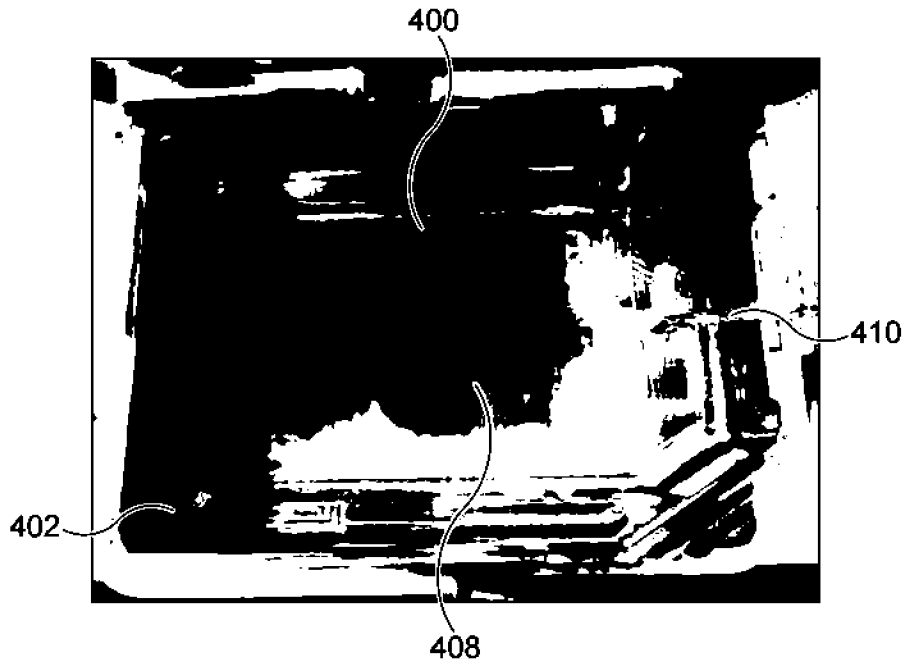
ФИГ. 36С



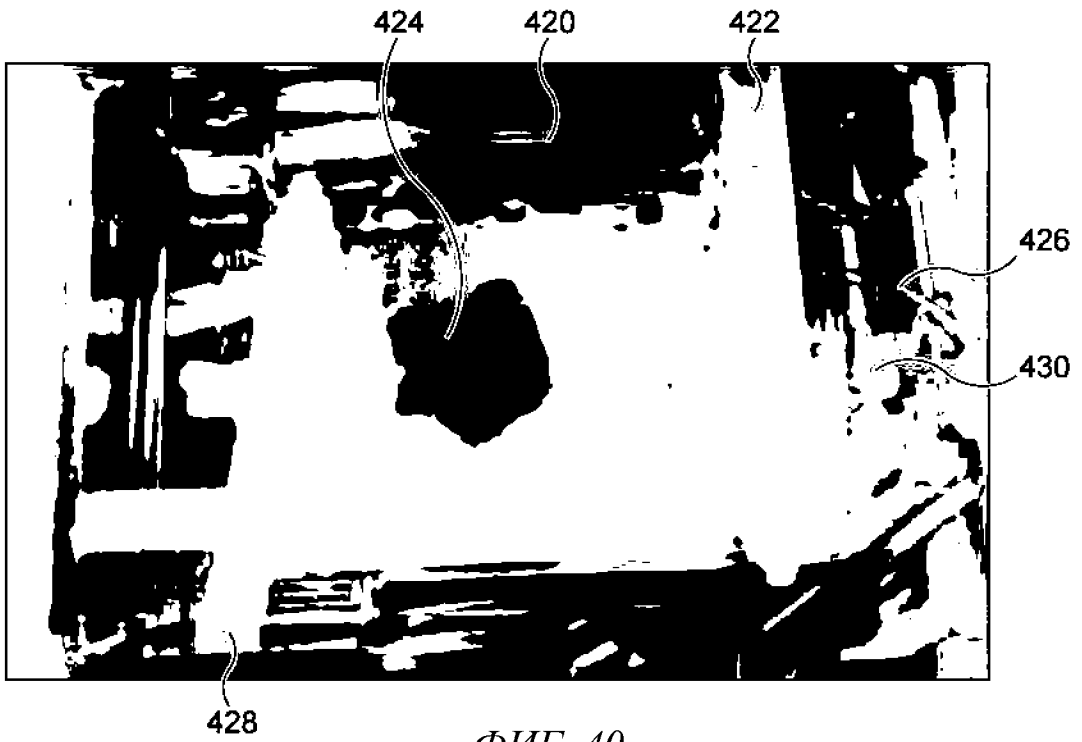
ФИГ. 37



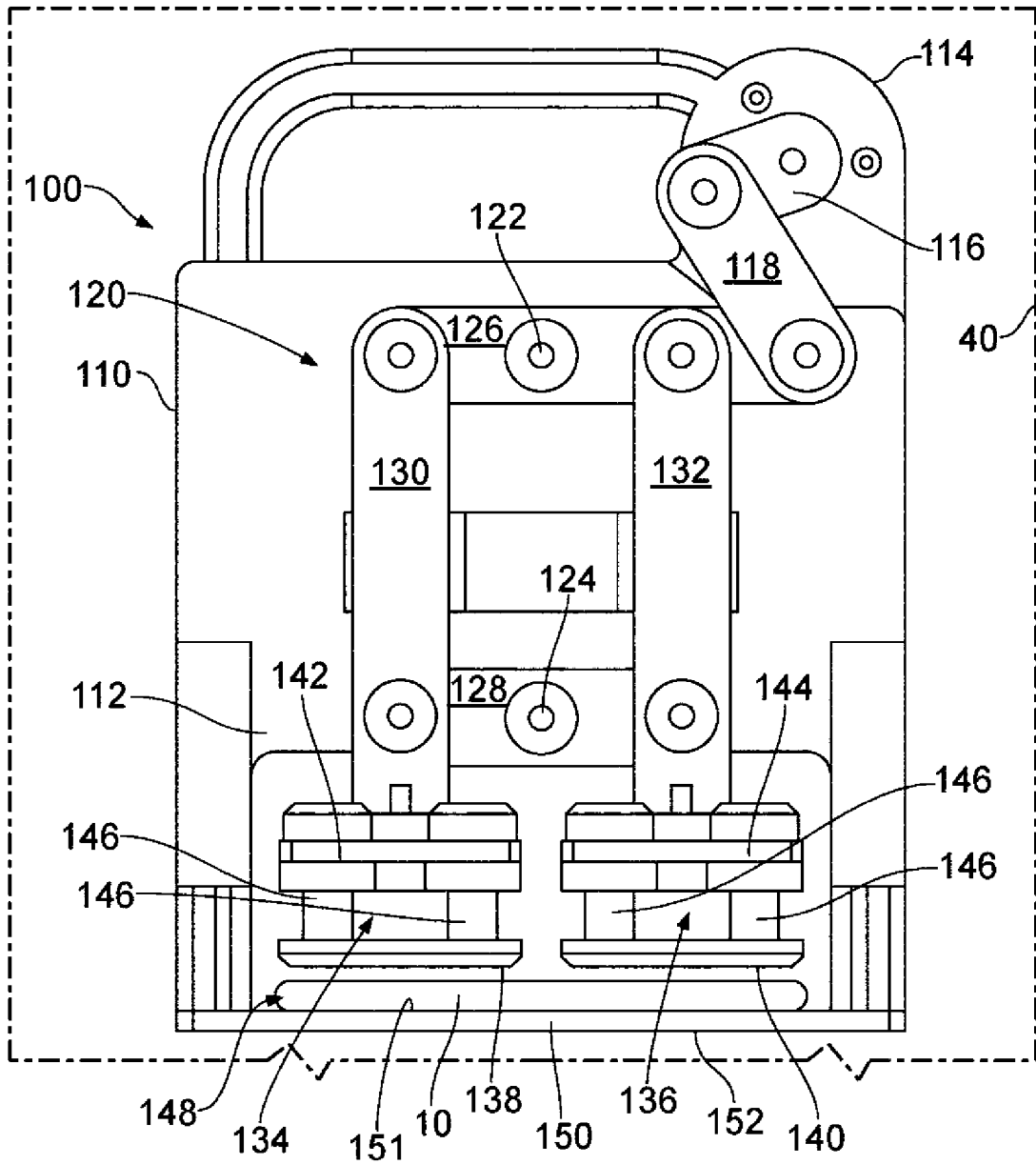
ФИГ. 38



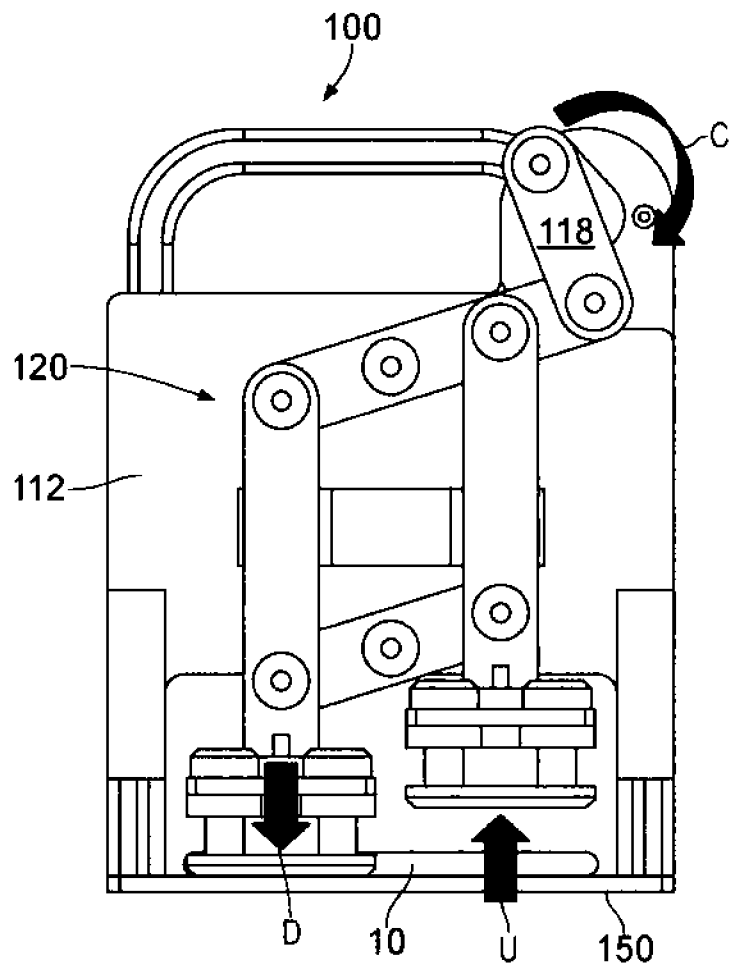
ФИГ. 39



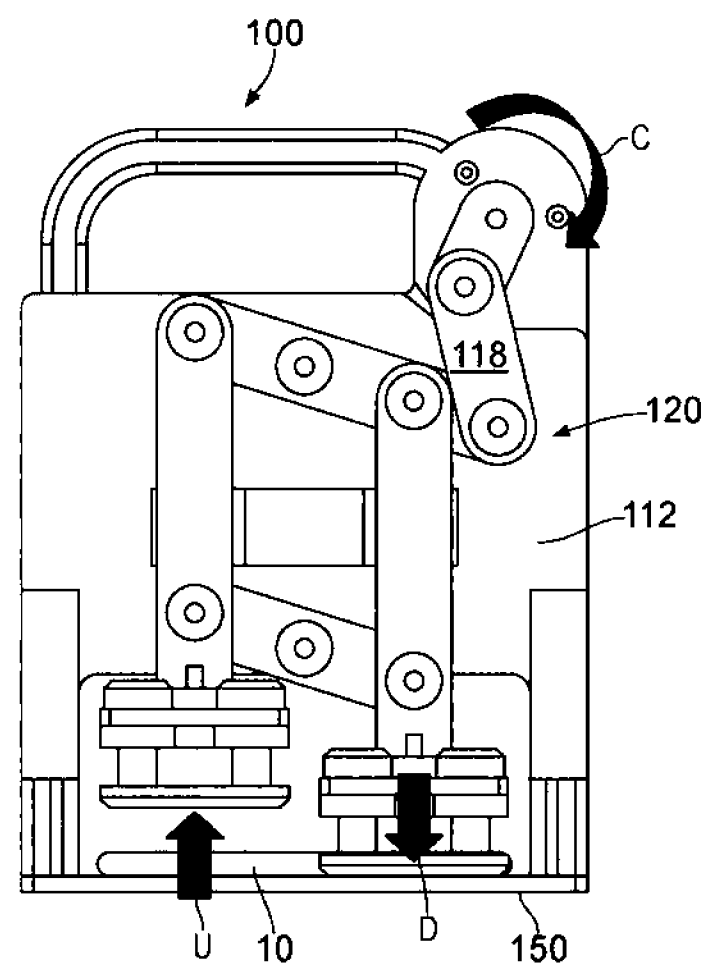
ФИГ. 40



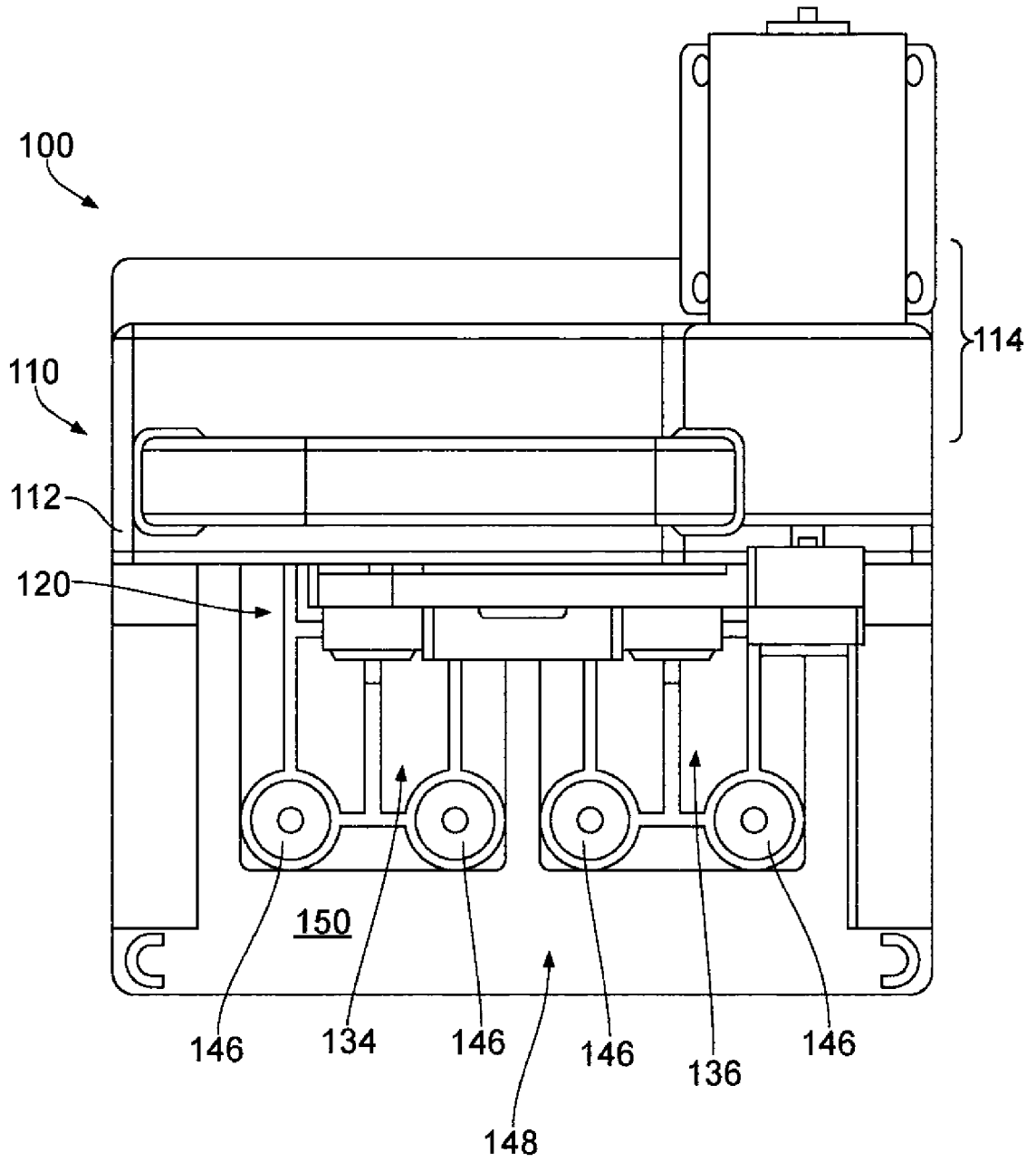
ФИГ. 41



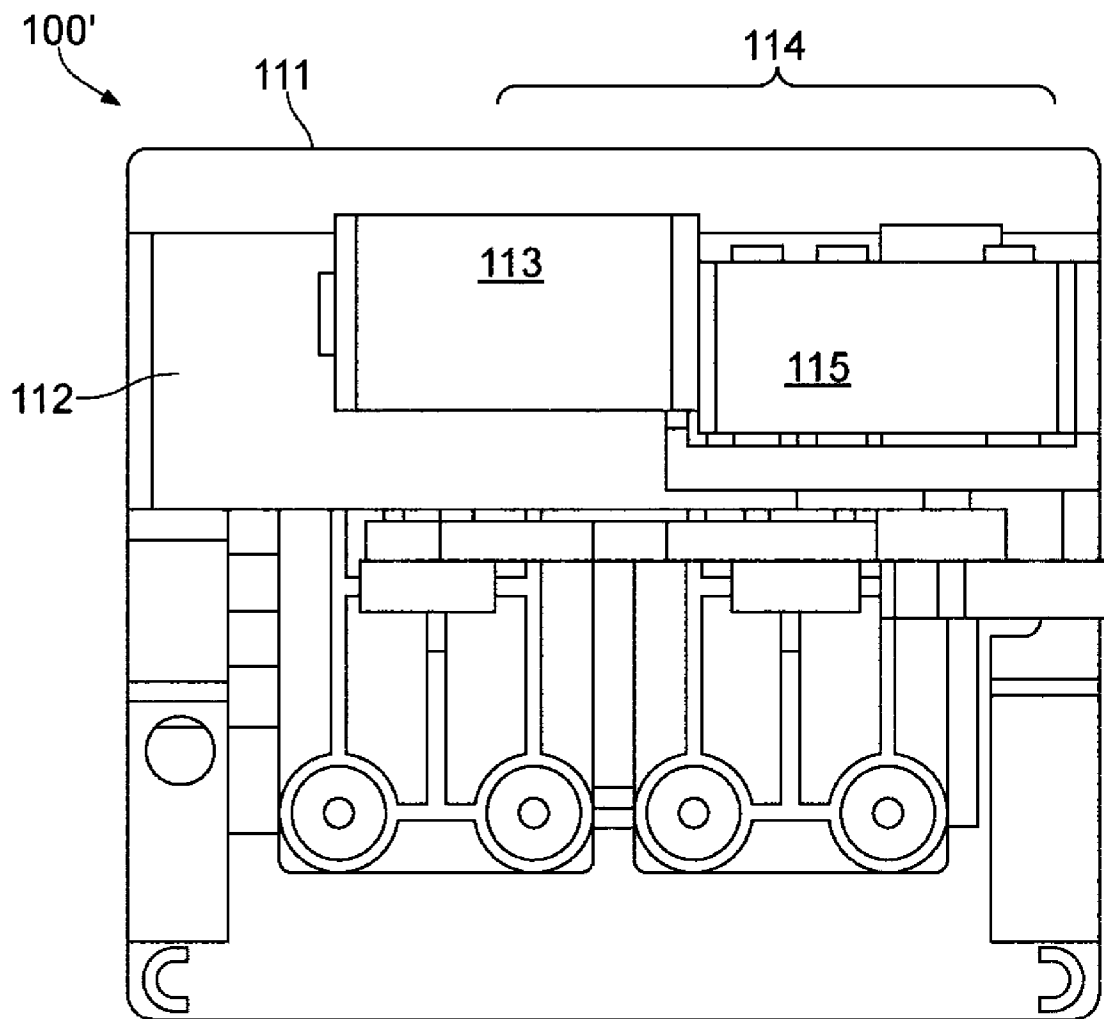
ФИГ. 42



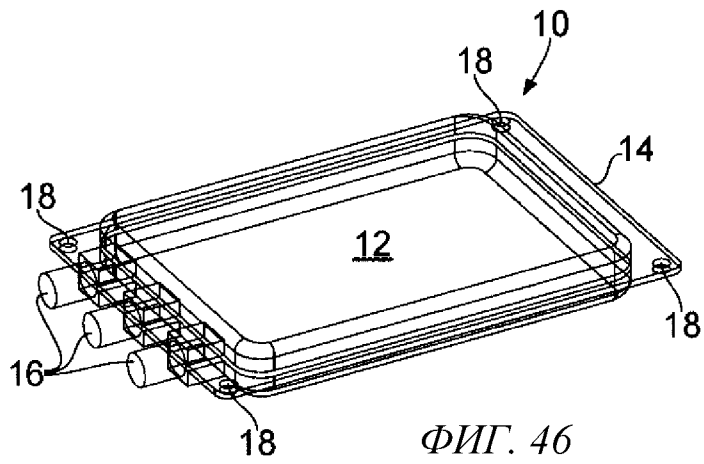
ФИГ. 43



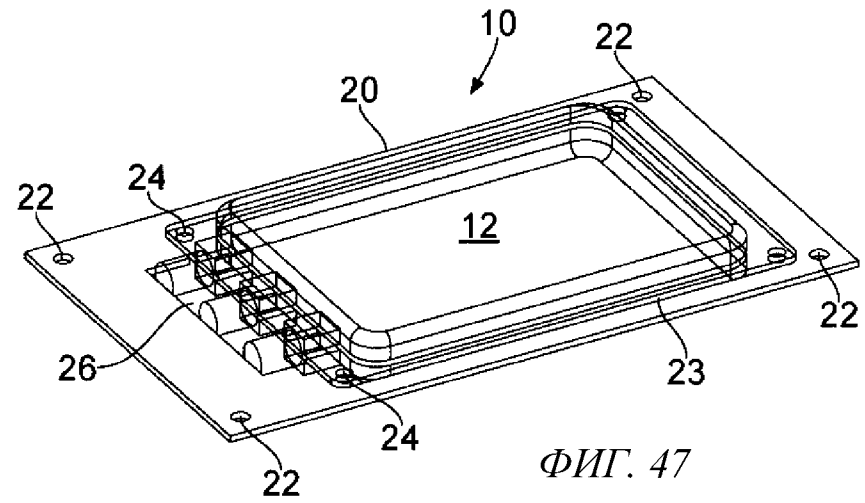
ФИГ. 44



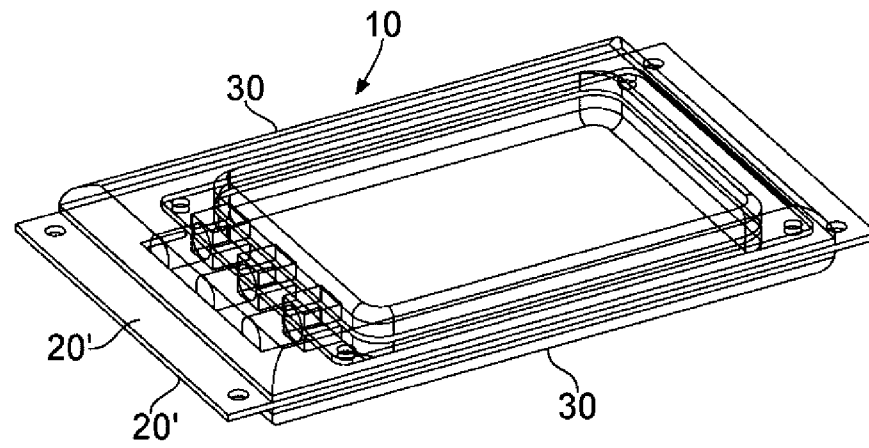
ФИГ. 45



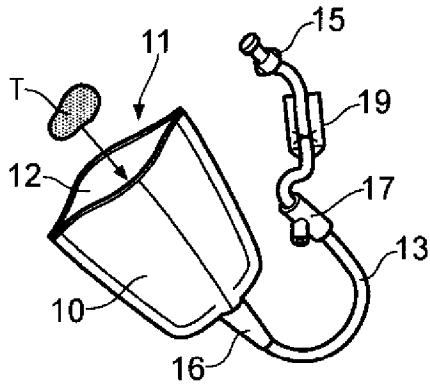
ФИГ. 46



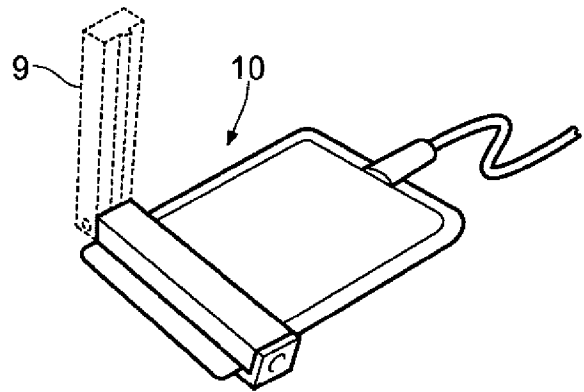
ФИГ. 47



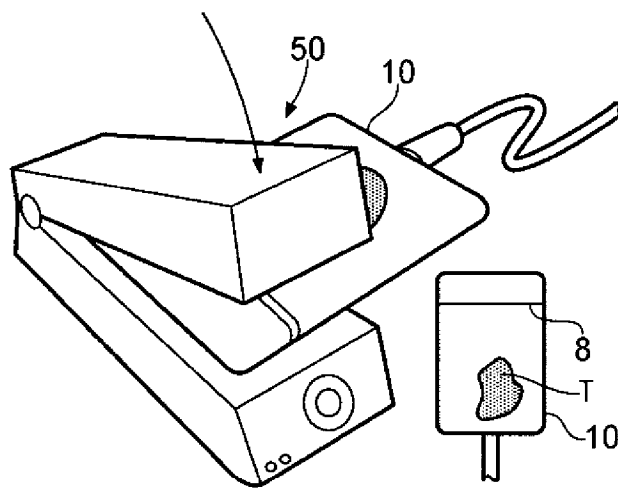
ФИГ. 48



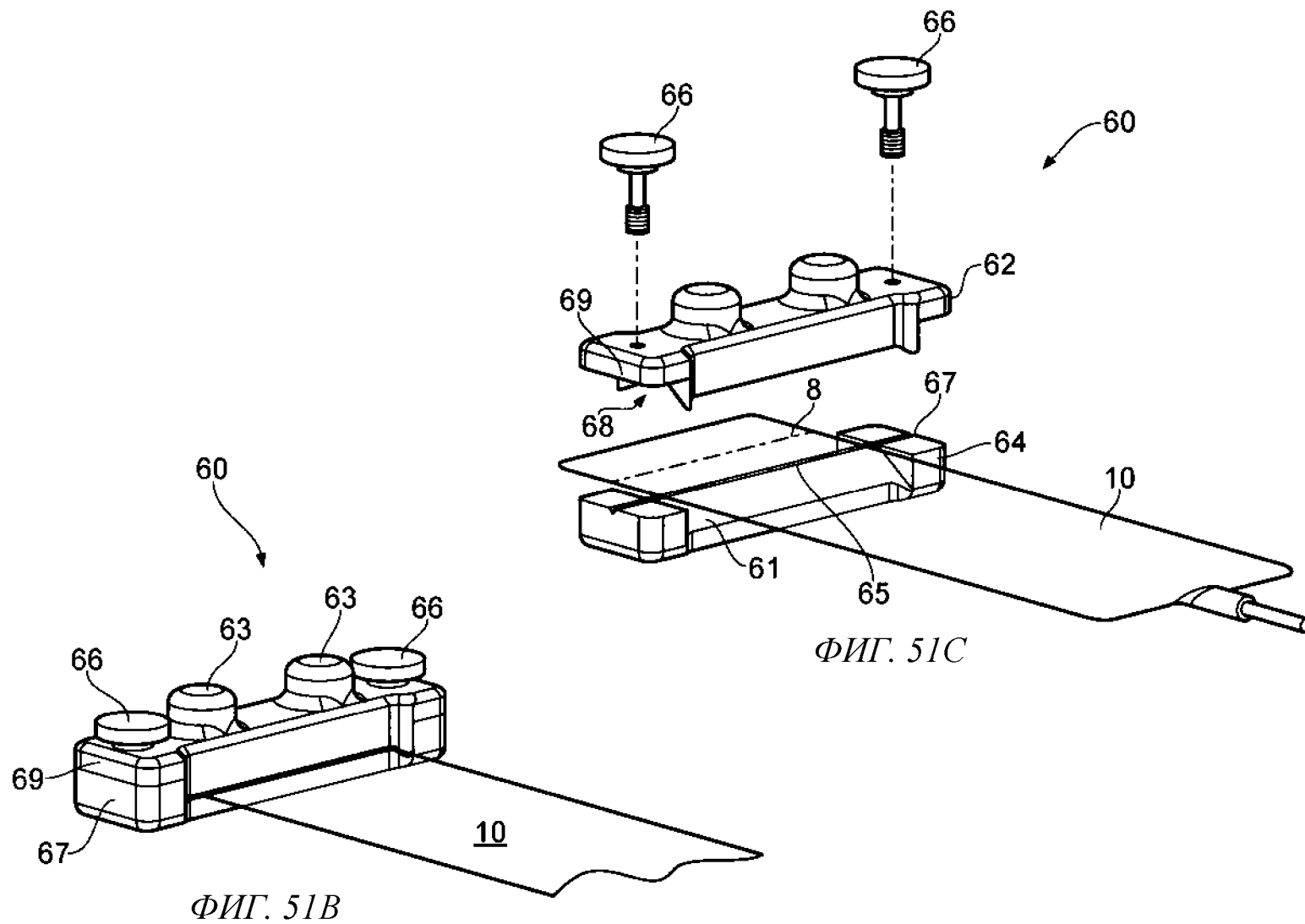
ФИГ. 49

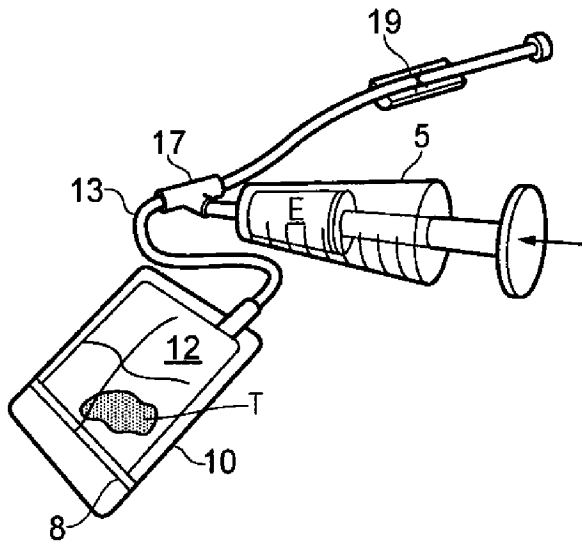


ФИГ. 50

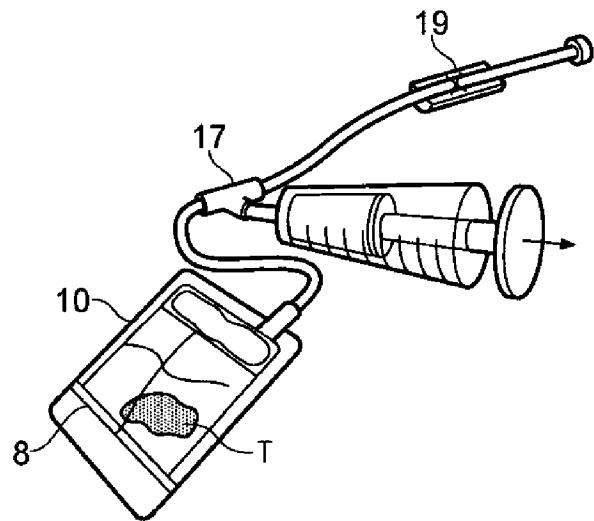


ФИГ. 51A

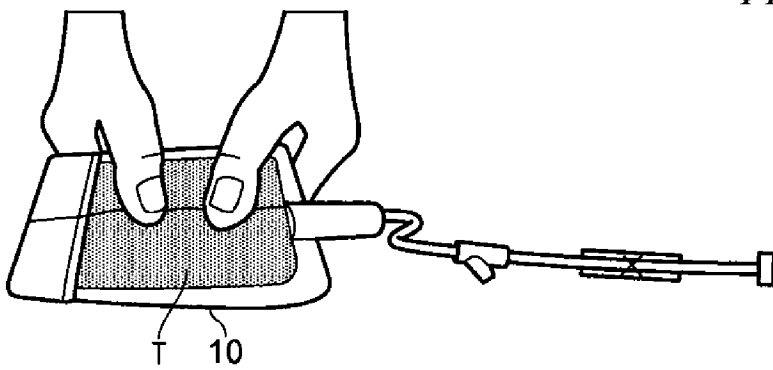




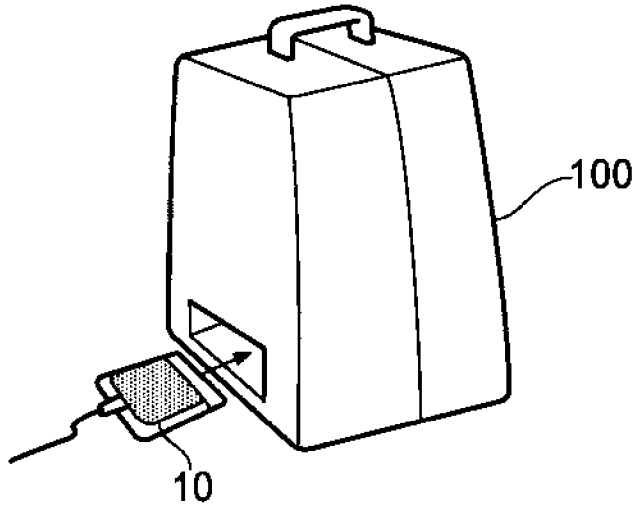
ФИГ. 52



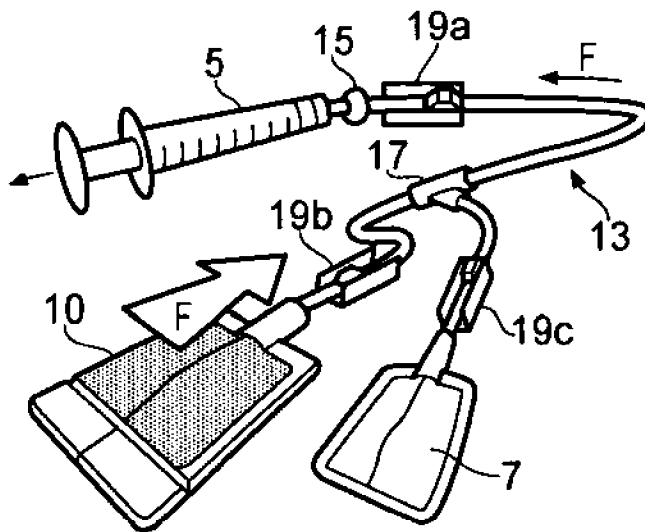
ФИГ. 53



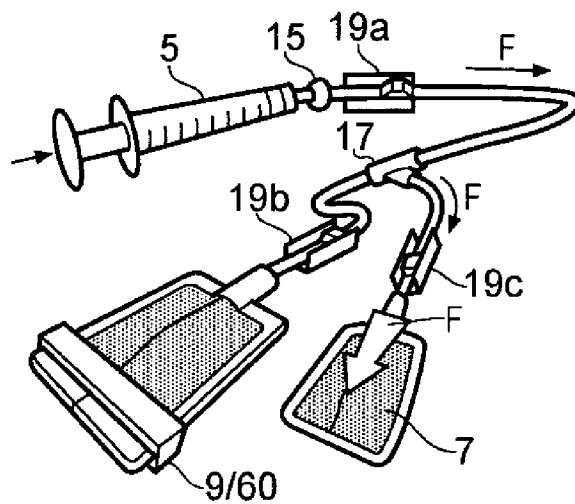
ФИГ. 54



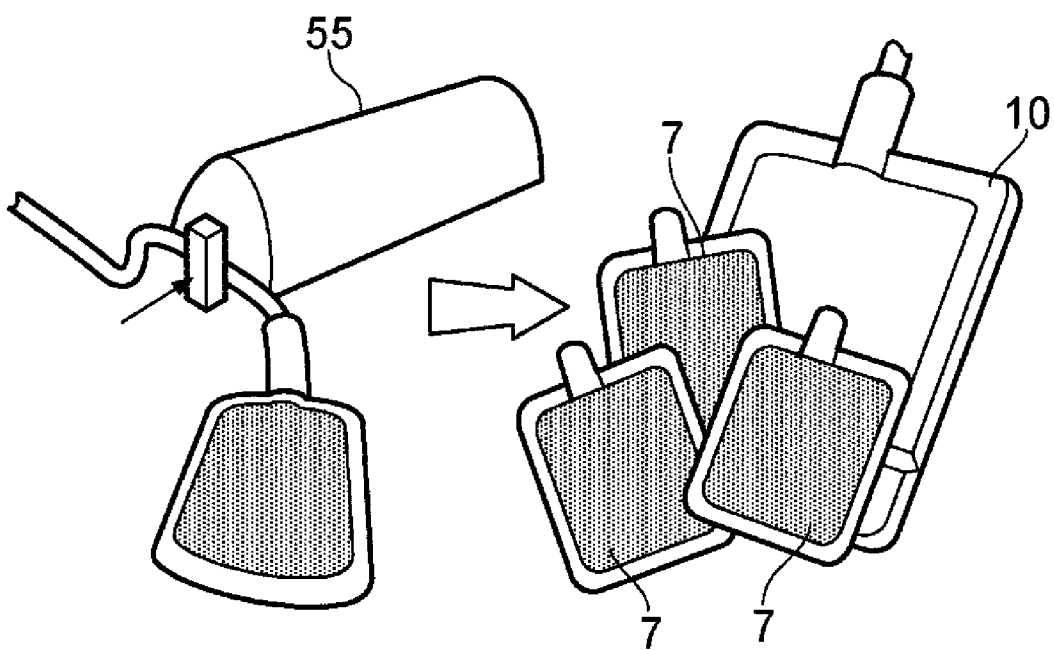
ФИГ. 55



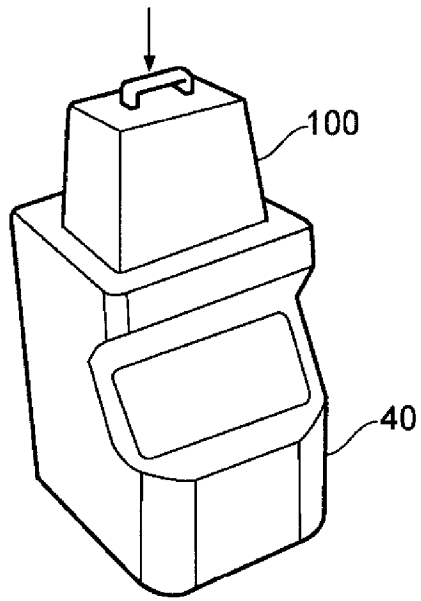
ФИГ. 56



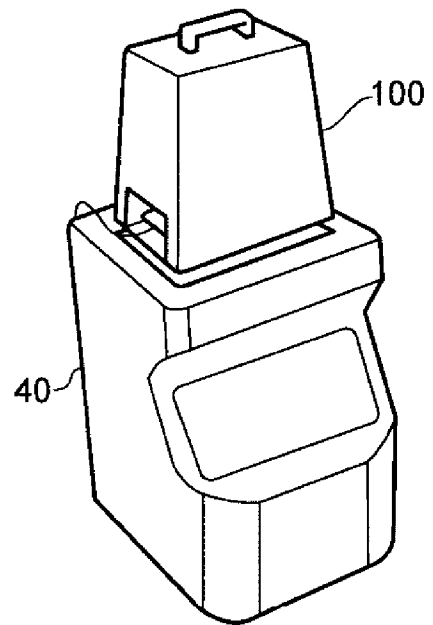
ФИГ. 57



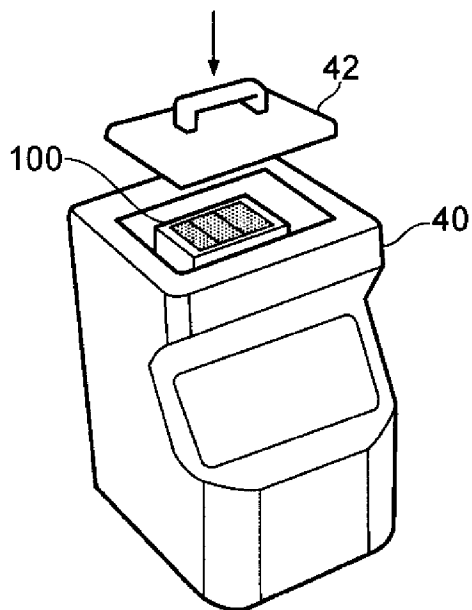
ФИГ. 58



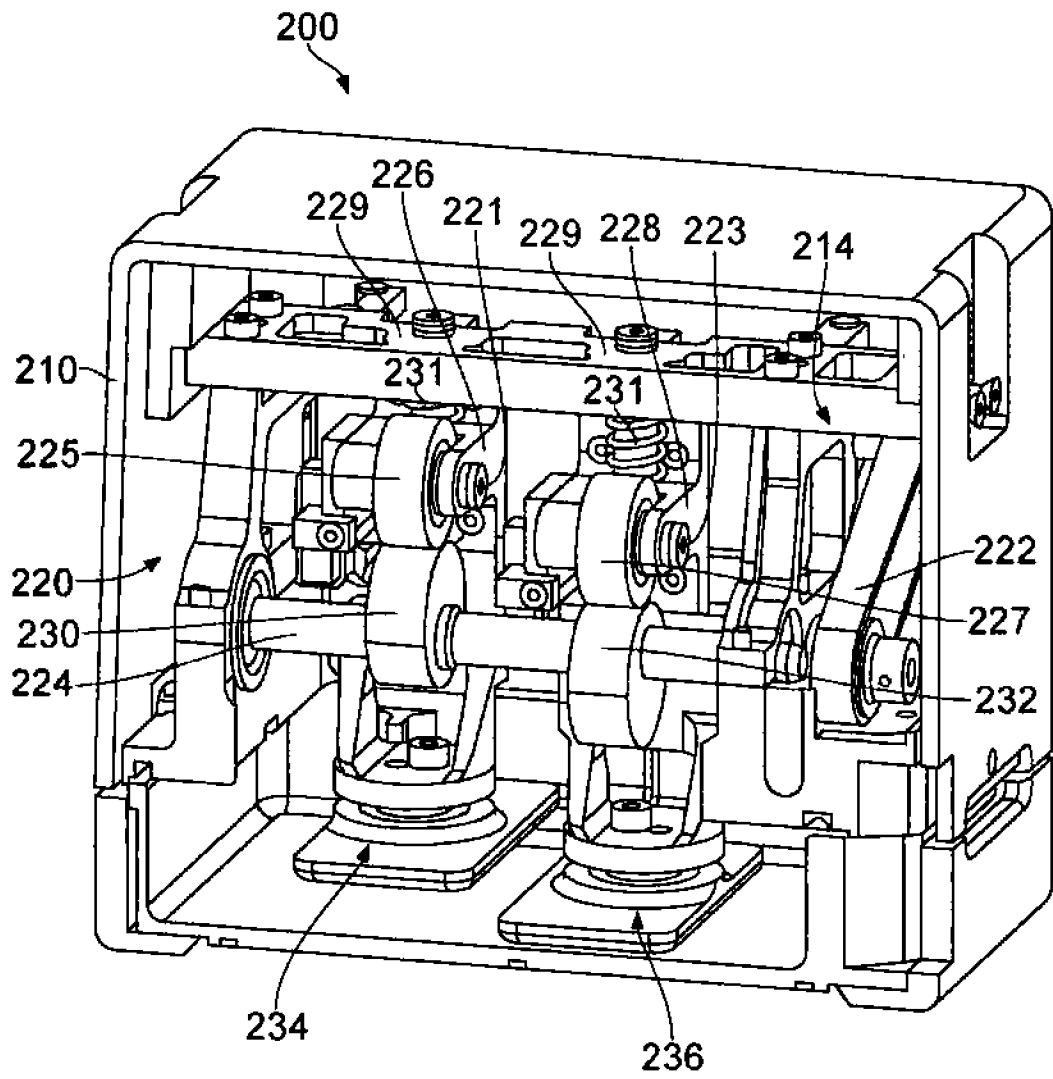
ФИГ. 59



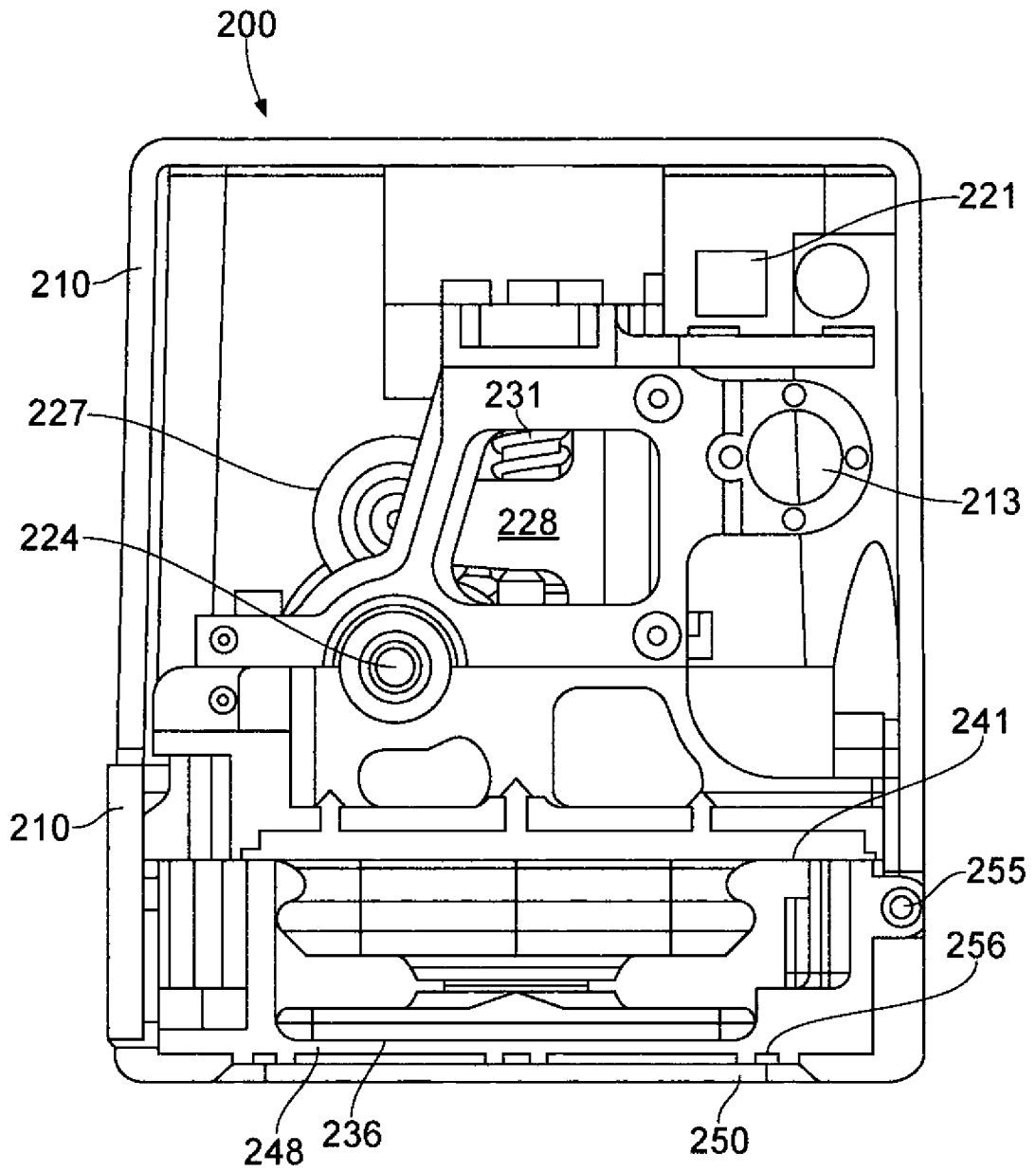
ФИГ. 60



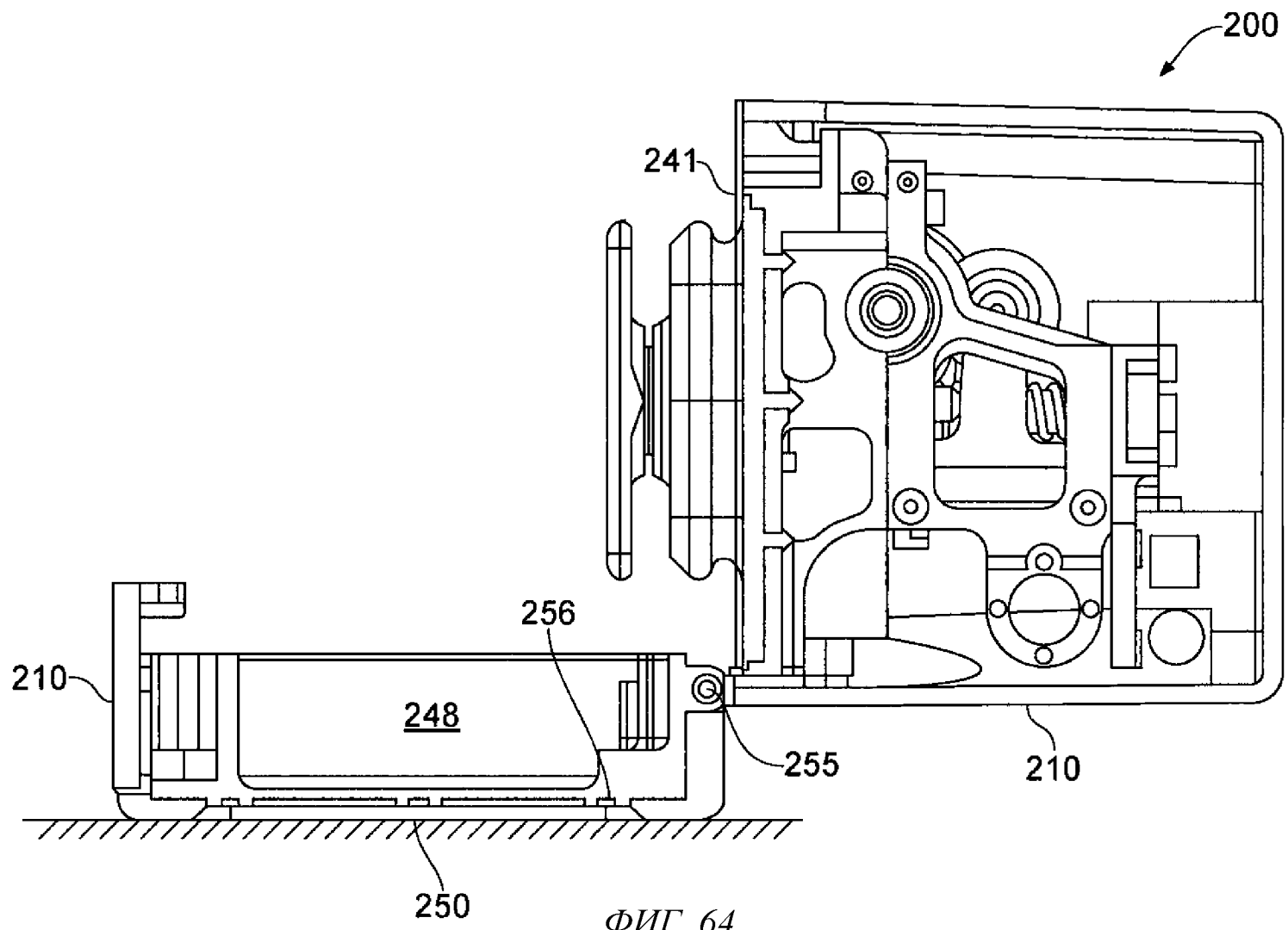
ФИГ. 61



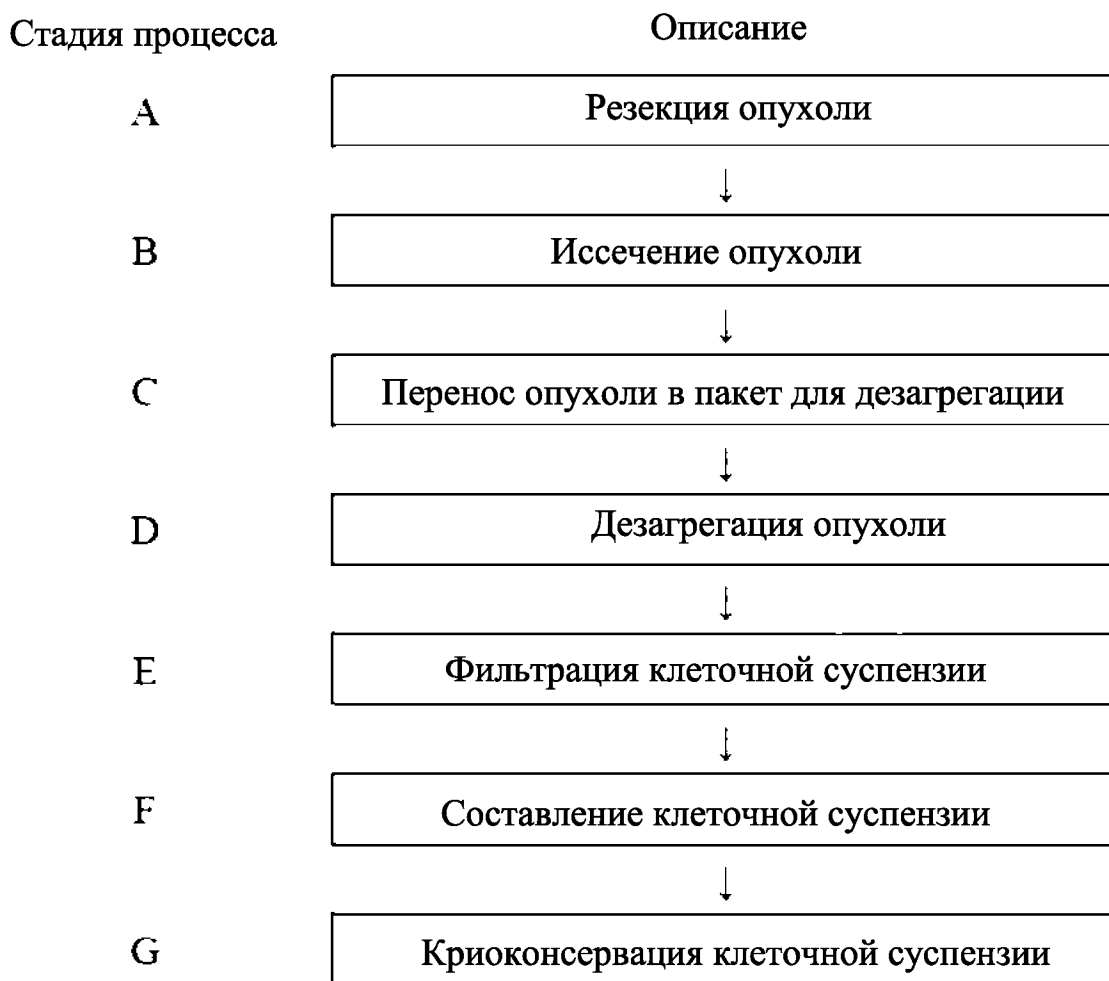
ФИГ. 62



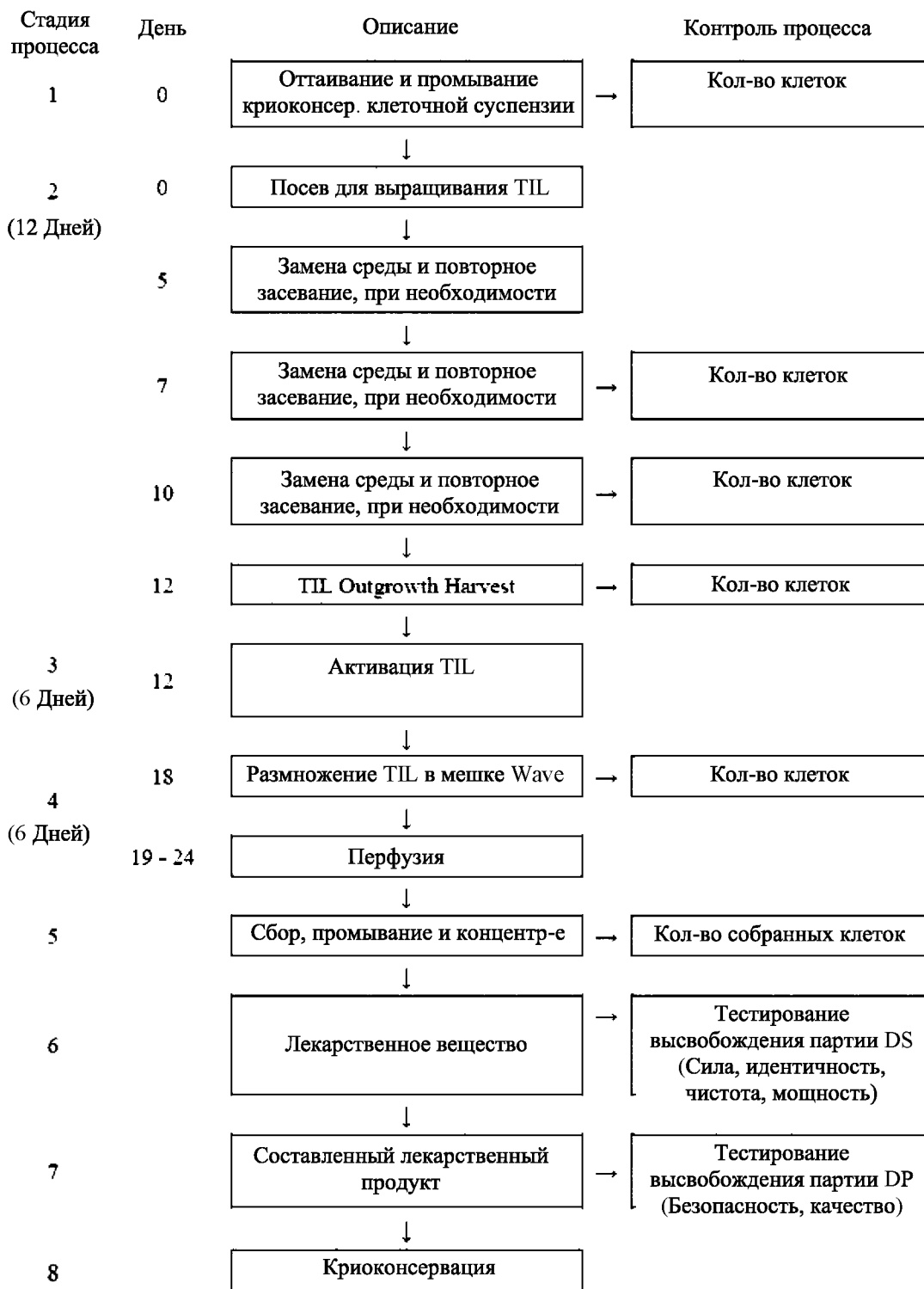
ФИГ. 63



ФИГ. 64

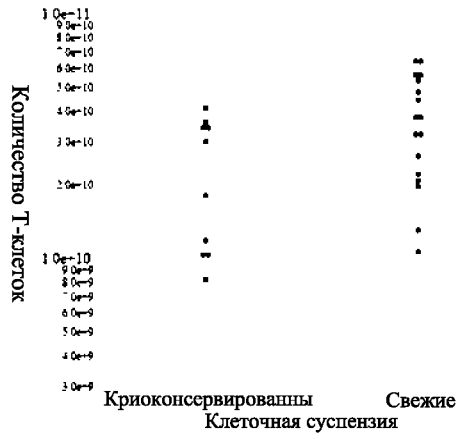


ФИГ. 65

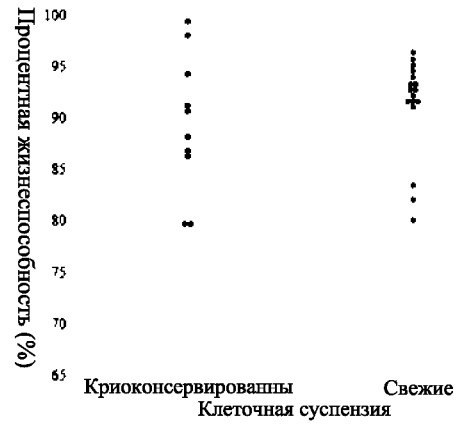


ФИГ. 66

A.



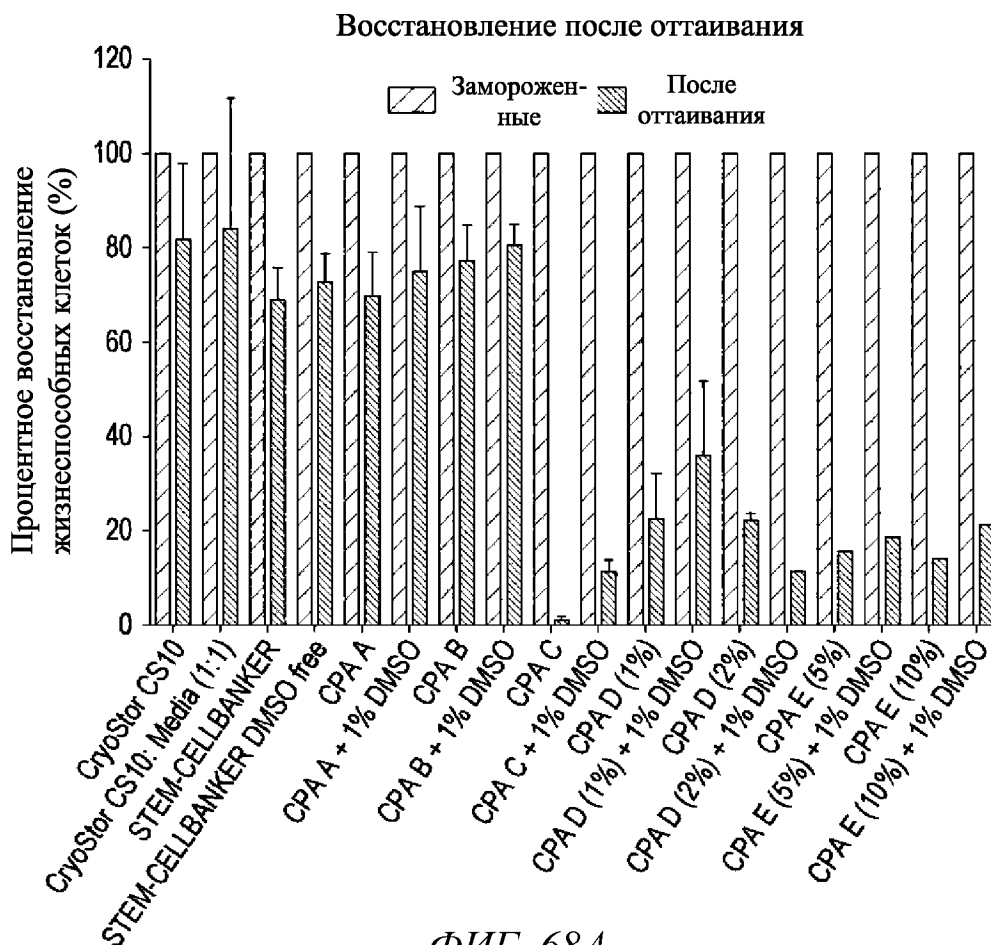
B.



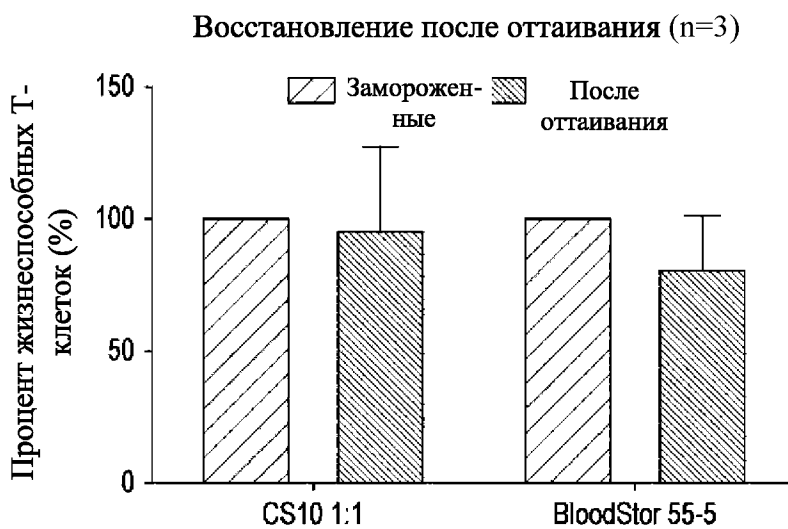
C.



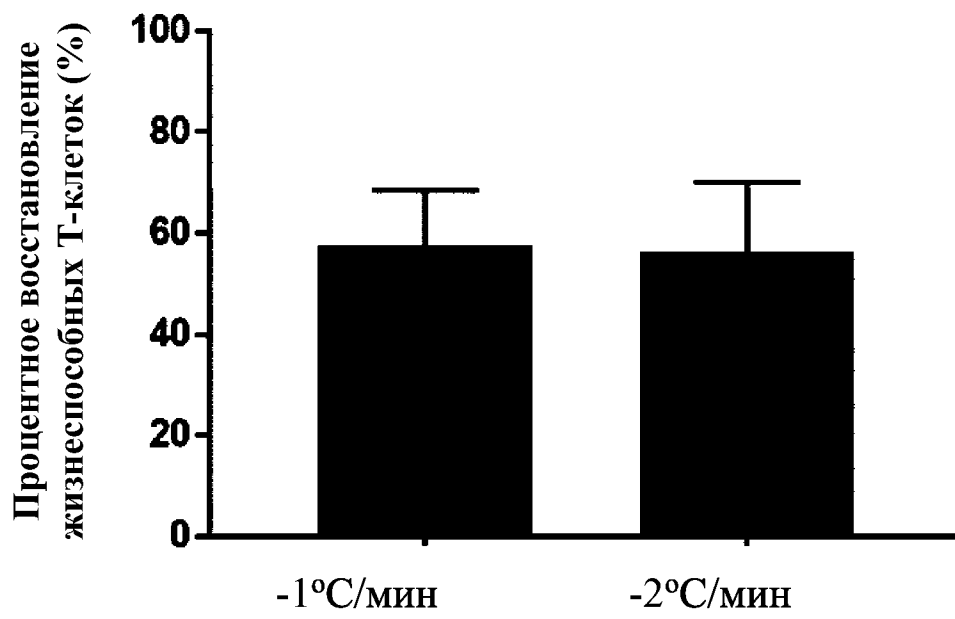
ФИГ. 67



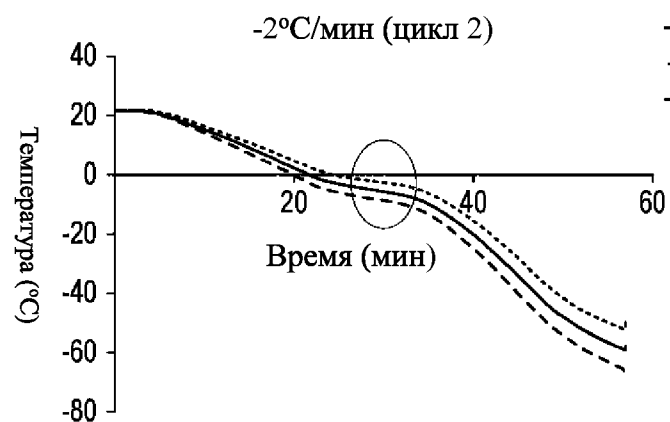
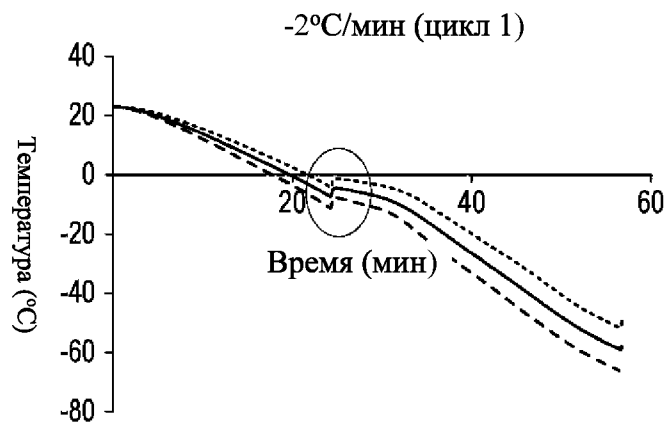
ФИГ. 68А



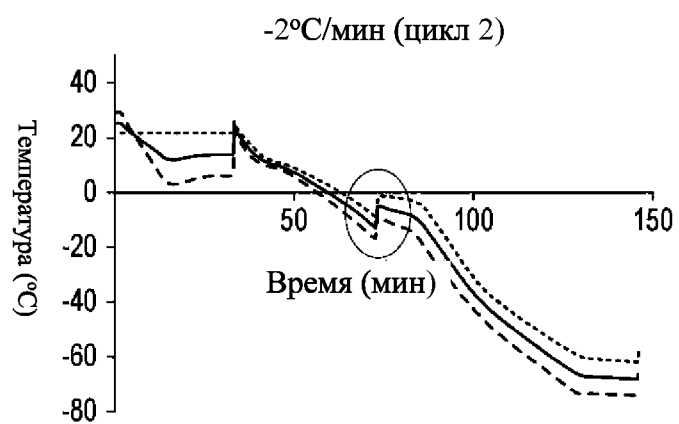
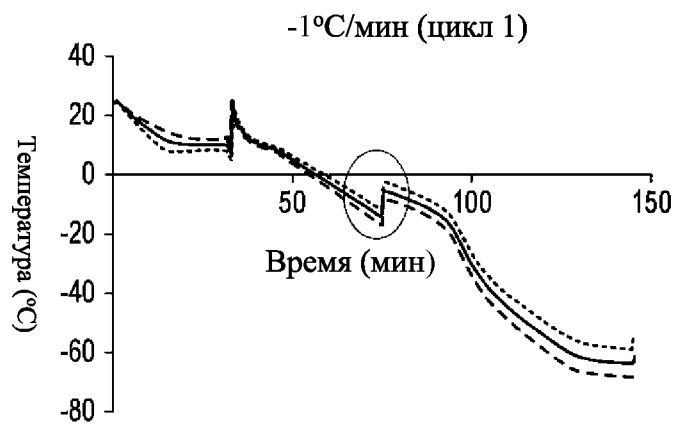
ФИГ. 68В



ФИГ. 69



--- Термопара 1
 Термопара 2
 — Среднее значение

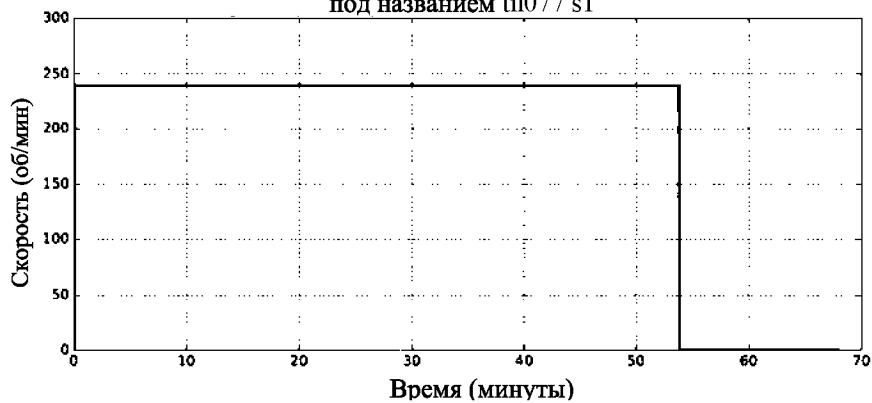


ФИГ. 70

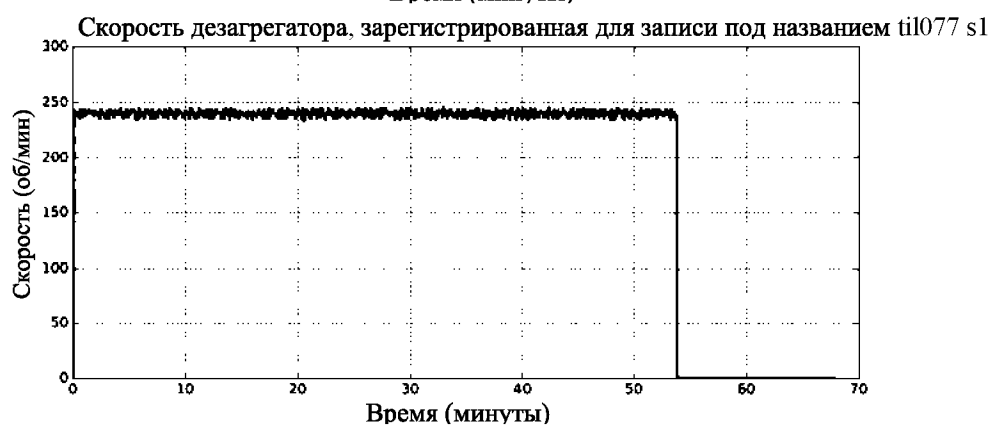
59 / 67

Заданная скорость дезагрегатора, зарегистрированная для записи под названием til077 s1

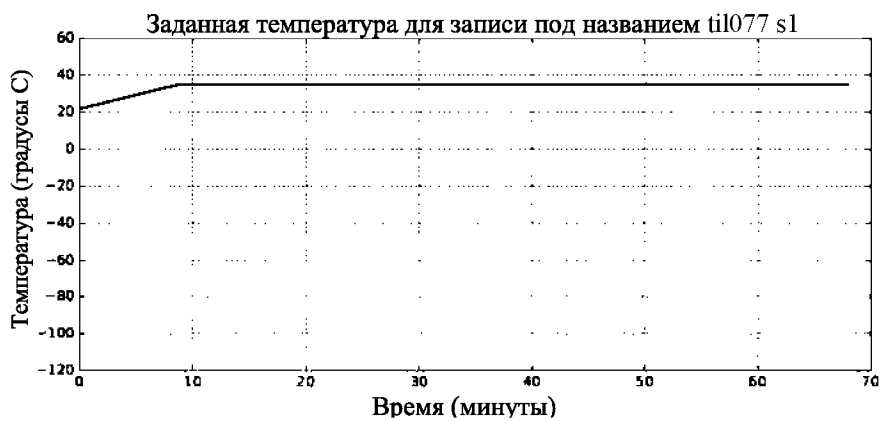
A.



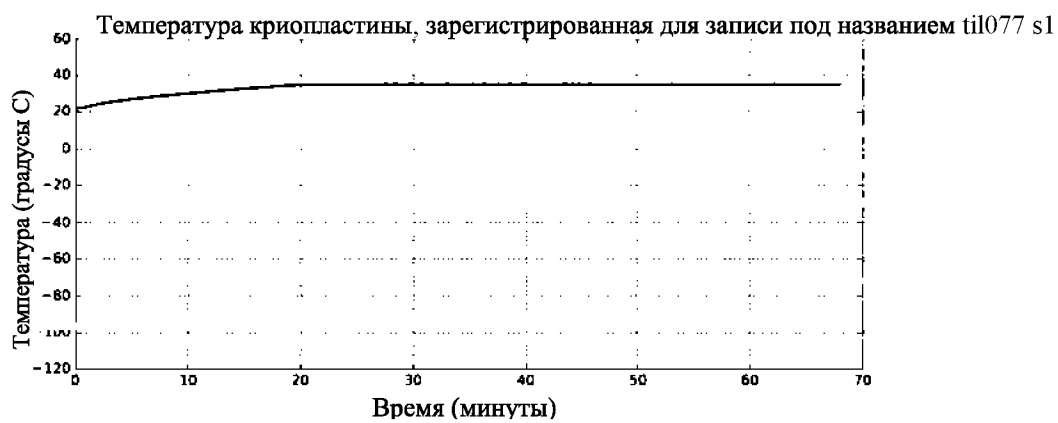
B.



C.



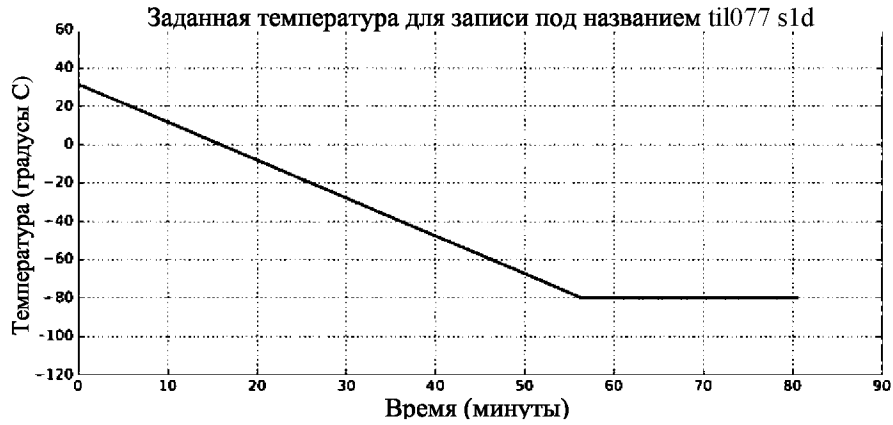
D.



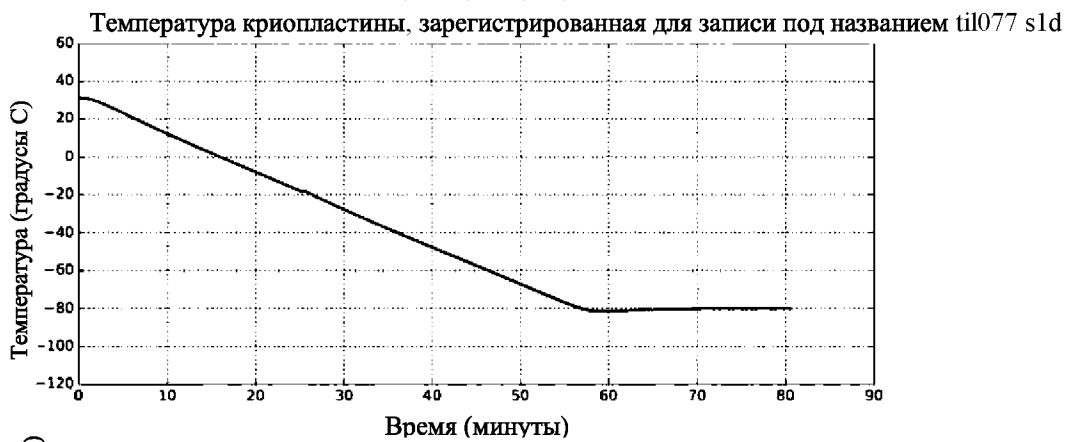
ФИГ. 71A-71D

60 / 67

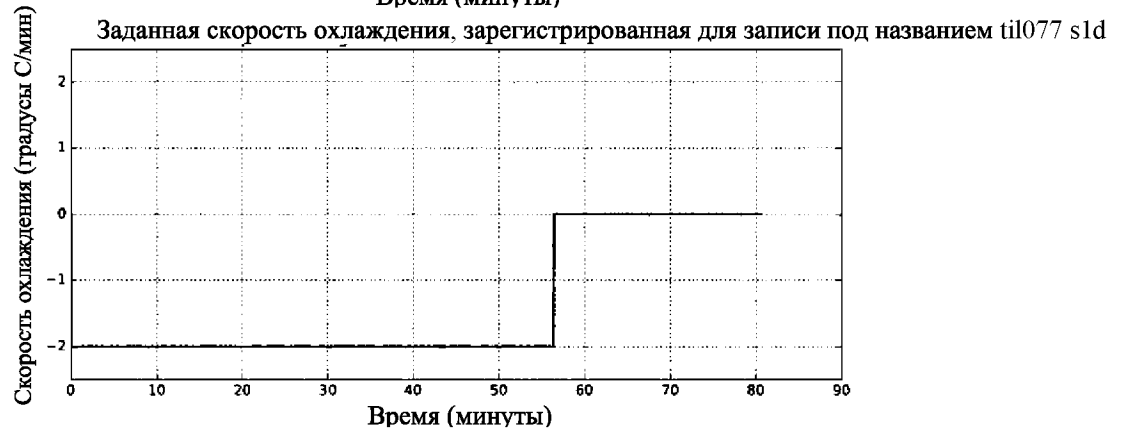
Е.



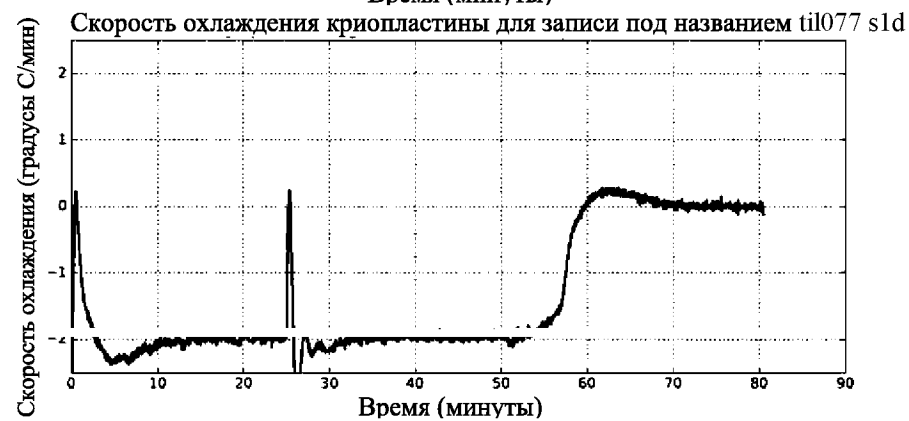
Ф.



Г.

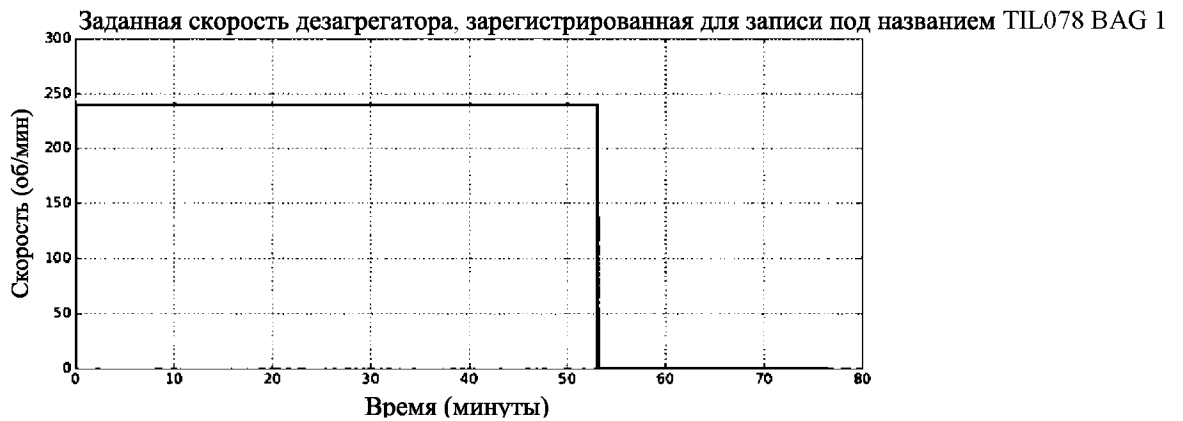


Н.

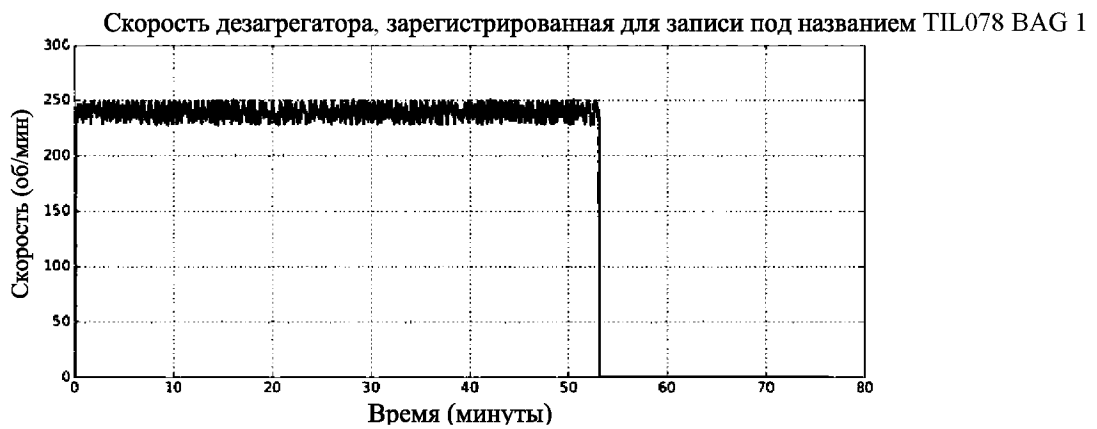


ФИГ. 71Е-71Н

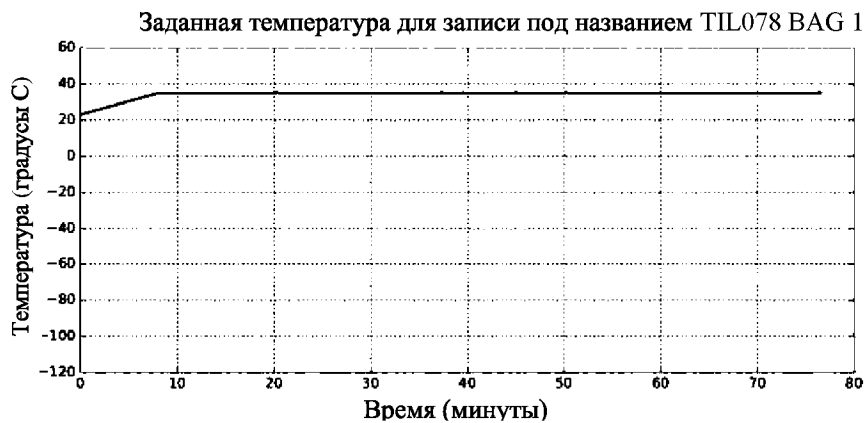
A.



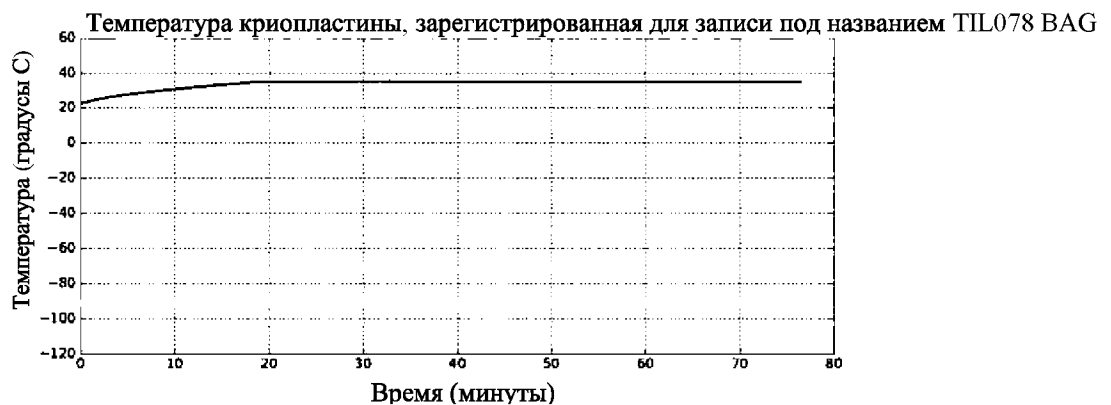
B.



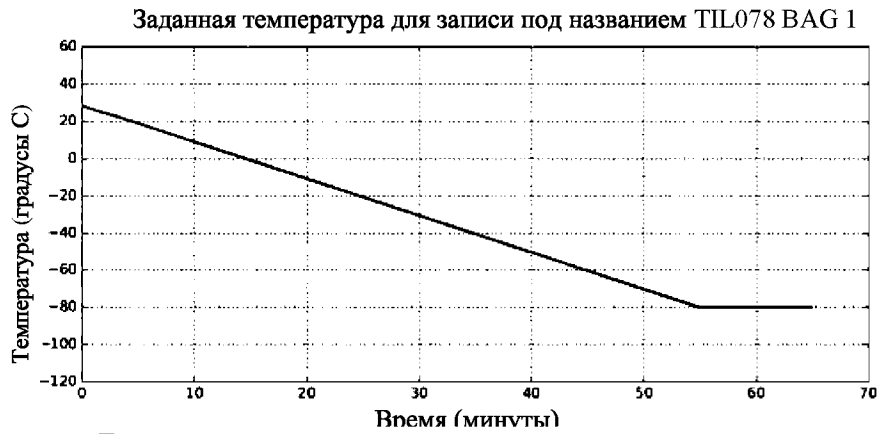
C.



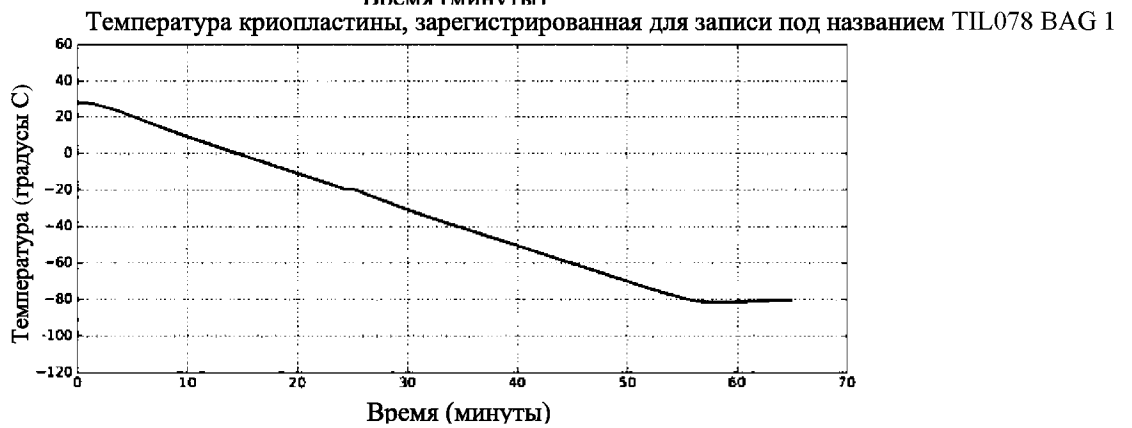
D.



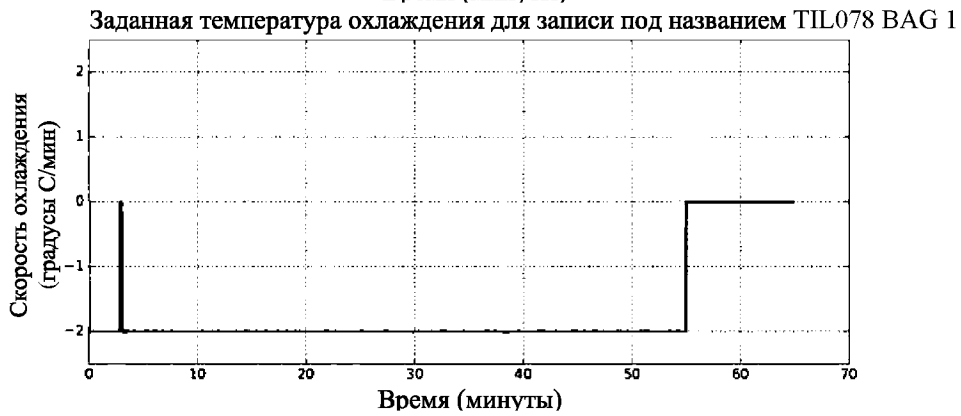
Е.



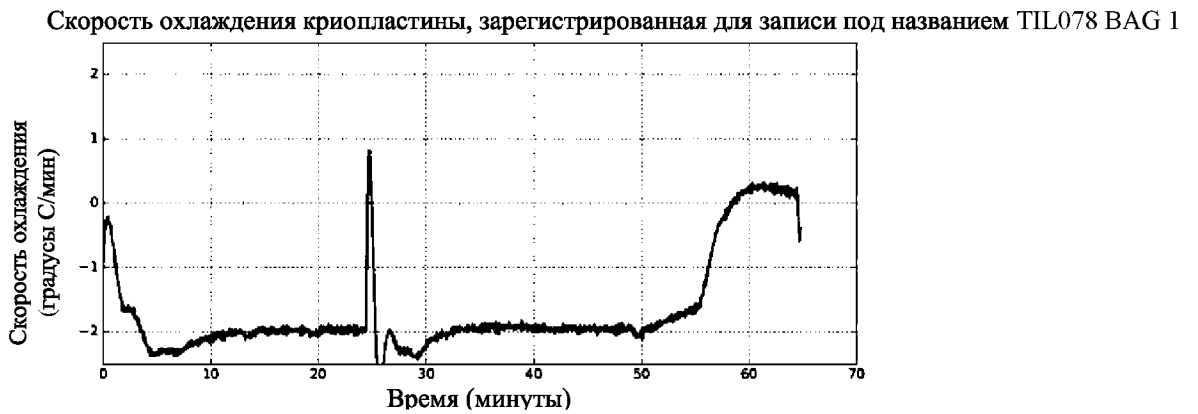
Ф.



Г.



Н.

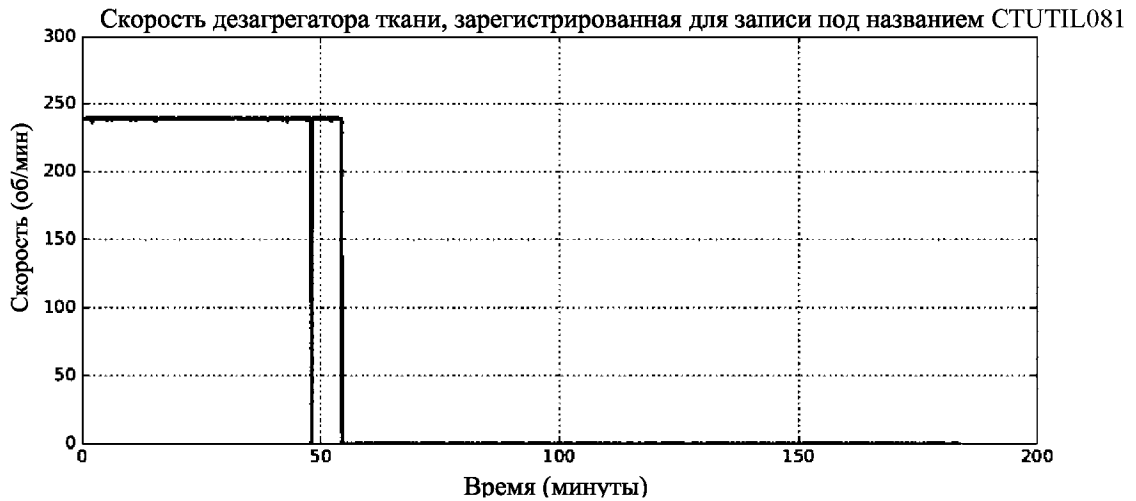


ФИГ. 72Е-72Н

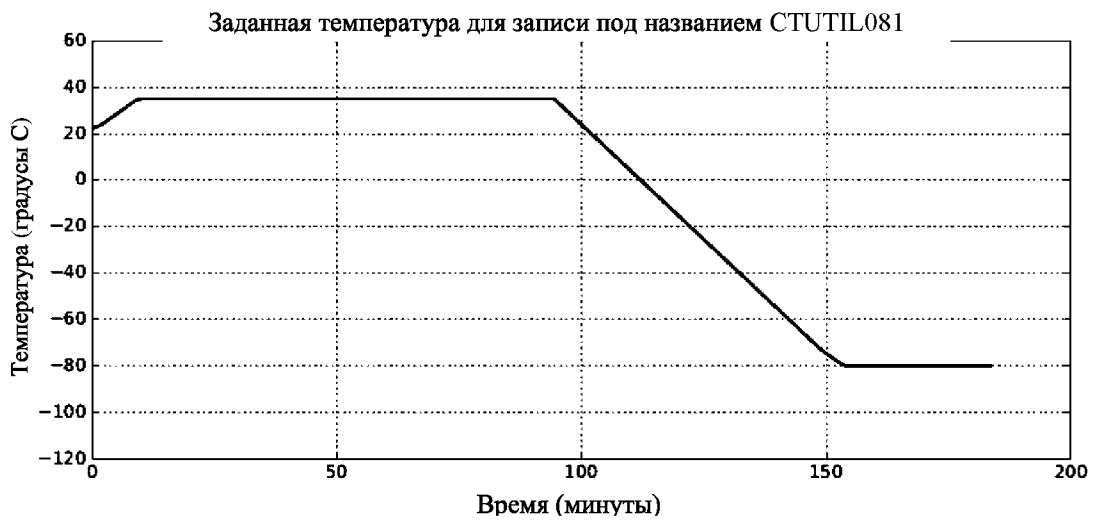
А.



В.



С.

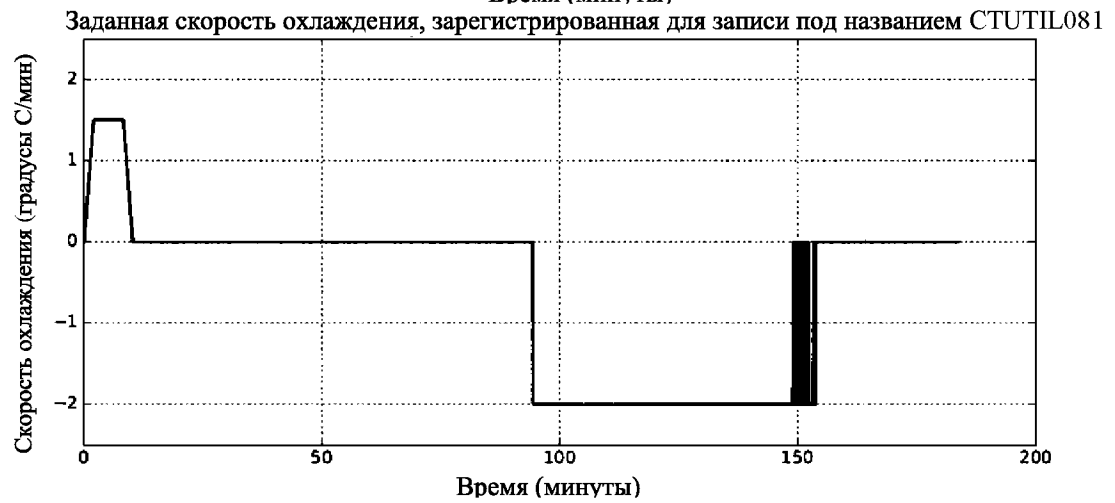


ФИГ. 73А-73С

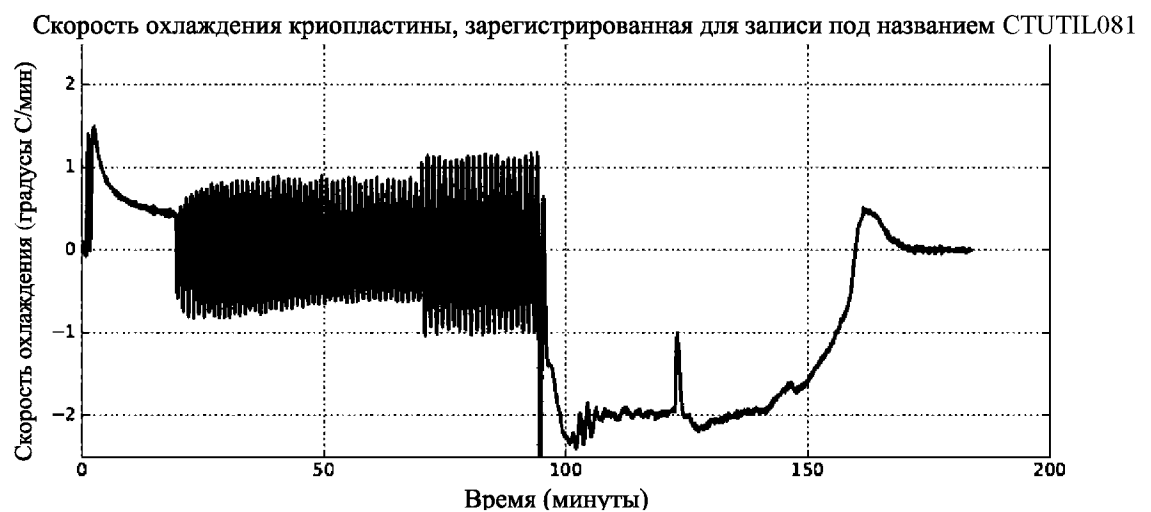
D.



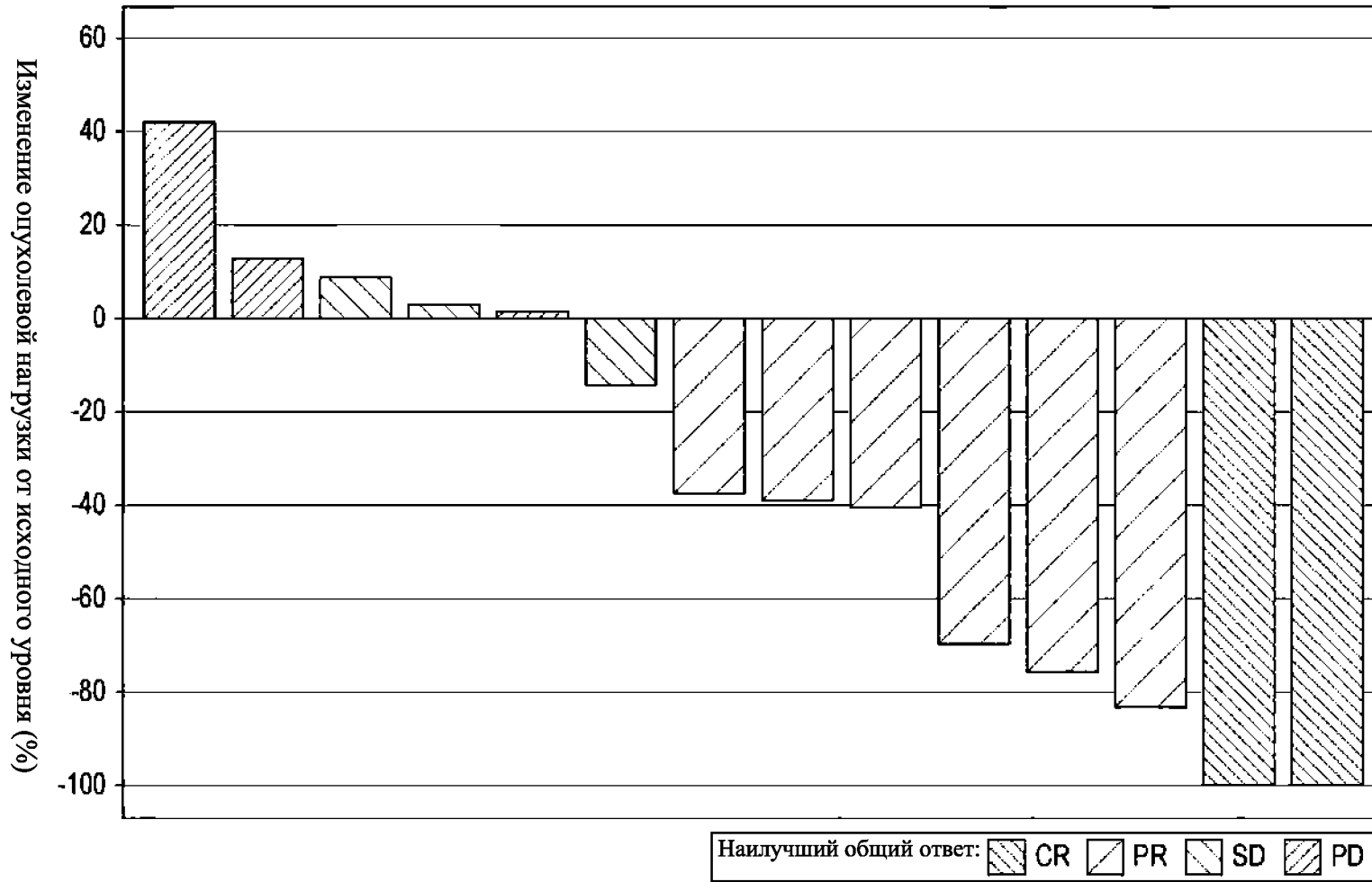
E.



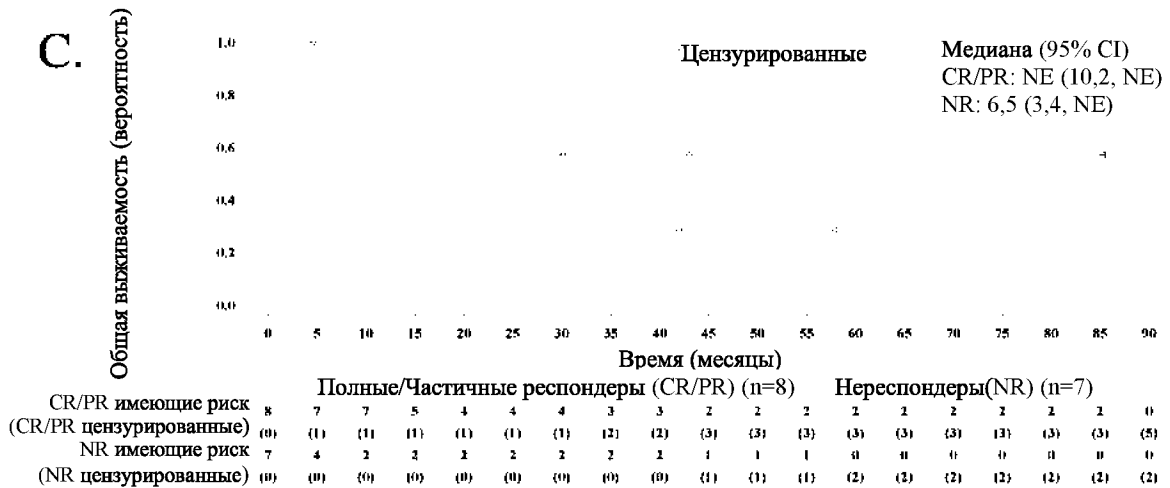
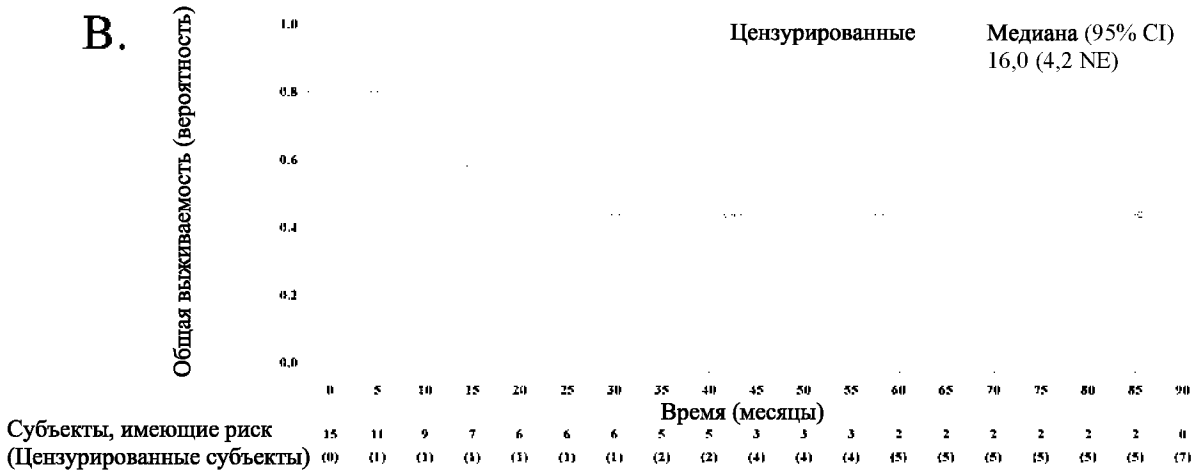
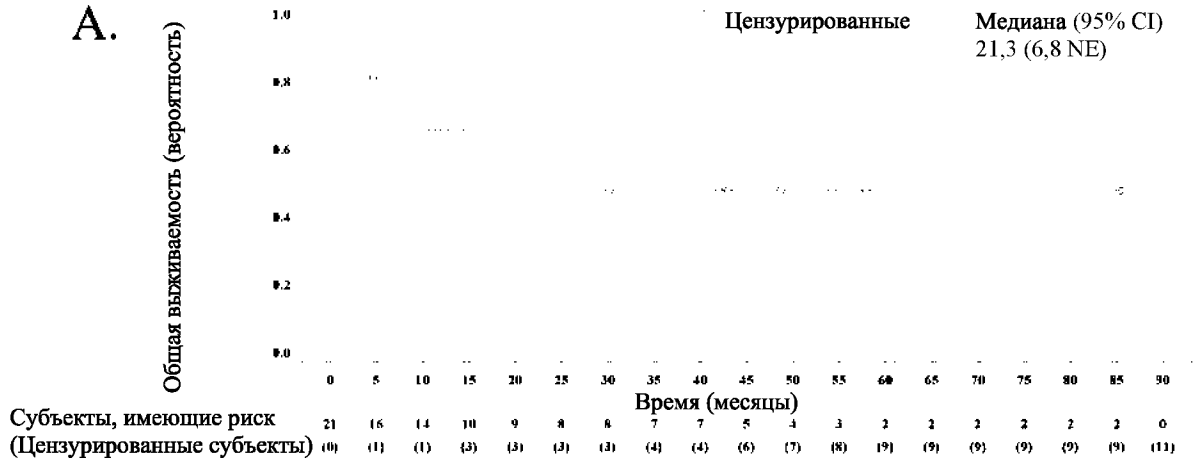
F.



ФИГ. 73D-73F

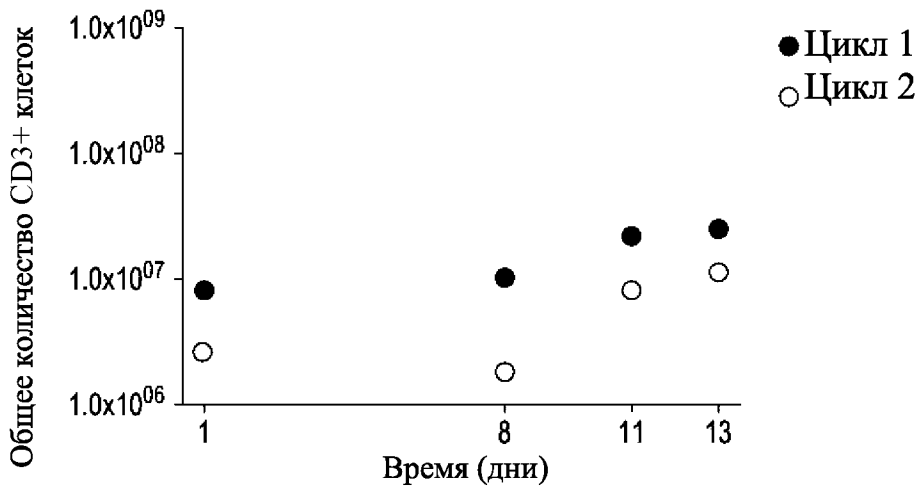


ФИГ. 74

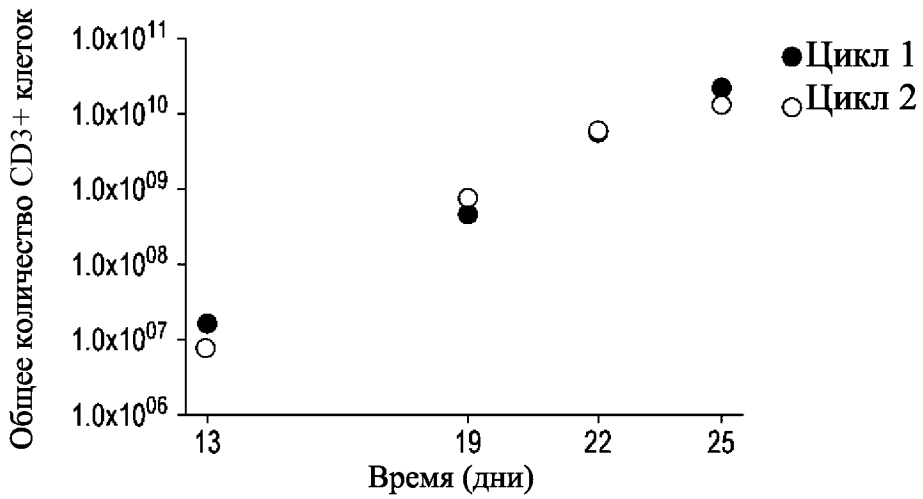


ФИГ. 75А-75С

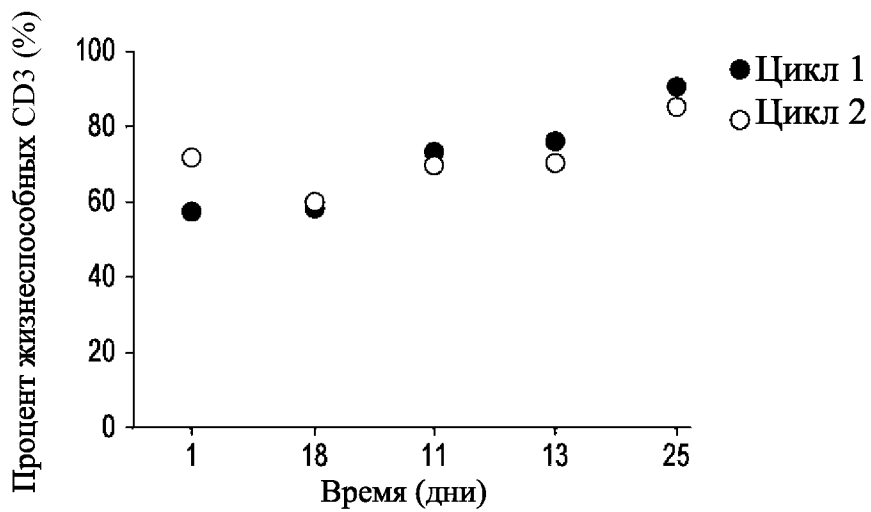
67 / 67



ФИГ. 76А



ФИГ. 76В



ФИГ. 76С