(19) Евразийское патентное ведомство

(11) 045580 (13) B1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2023.12.07

(21) Номер заявки
202293035

(22) Дата подачи заявки
2021.04.22

(51) Int. Cl. ***C12N 5/0783*** (2010.01)
G16H 10/00 (2018.01)
A61P 35/00 (2006.01)
G16H 20/00 (2018.01)
G16H 20/10 (2018.01)
G16H 20/17 (2018.01)

(54) СИСТЕМЫ И СПОСОБЫ КООРДИНАЦИИ ПРОИЗВОДСТВА КЛЕТОК ДЛЯ ИНДИВИДУАЛЬНОЙ ИММУНОТЕРАПИИ

(31) **63/013,942; 63/155,711; 63/159,806**
(32) **2020.04.22; 2021.03.02; 2021.03.11**
(33) **US**
(43) **2023.02.10**
(86) **PCT/US2021/028709**
(87) **WO 2021/216920 2021.10.28**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
АЙОВЭНС БАЙОТЕРАПЬЮТИКС, ИНК. (US)

(72) Изобретатель:
Брукс Энн, Макрайдс Стив, Ланци Кристин (US)

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

(56) WO-A1-2019055896
US-A1-2003175242
BRUCE L. LEVINE ET AL.: "Global Manufacturing of CAR T Cell Therapy", MOLECULAR THERAPY-METHODS & CLINICAL DEVELOPMENT, vol. 4, 4 March 2017 (2017-03-04), pages 92-101, XP055510414, GB ISSN: 2329-0501, DOI:10.1016/j.omtm.2016.12.006, the whole document, figure 4
US-A1-2018325954
EMILY L. HOPEWELL ET AL.: "Tumor-infiltrating lymphocytes: Streamlining a complex manufacturing process", CYTOTHERAPY, vol. 21, no. 3, 30 November 2018 (2018-11-30), pages 307-314, XP055717425, GB, ISSN: 1465-3249, DOI:10.1016/j.jcyt.2018.11.004, the whole document, table 1, figures 1-3

(57) В изобретении способ координации производства размноженного продукта клеточной терапии для пациента может включать прием запроса на заказ клеток для размножения продукта клеточной терапии для пациента; генерирование индивидуального идентификатора пациента или идентификатора заказа клеток, связанного с запросом на заказ клеток; и инициирование процесса размножения продукта клеточной терапии по меньшей мере из части солидной опухоли, полученной от пациента. Если параметры приемлемости размноженного продукта клеточной терапии не соответствуют определенным критериям приемлемости во второй момент времени, следующий за первым моментом времени в процессе размножения, определяют, возможно ли повторное выполнение размножения продукта клеточной терапии с помощью методики размножения клеток с первого момента времени на основе параметров приемлемости во второй момент времени. Если такое повторное выполнение размножения возможно, расписание лечебных событий пациента, в которых применяется размноженный продукт клеточной терапии, изменяют.

045580 B1

045580 B1

Перекрестная ссылка на родственные заявки

Настоящая заявка испрашивает приоритет по предварительной заявке США № 63/013942, поданной 22 апреля 2020 г., предварительной заявке США № 63/155711, поданной 2 марта 2021 г., и предварительной заявке США № 63/159806, поданной 11 марта 2021 г., каждая из которых полностью включена в настоящий документ посредством ссылки для всех целей.

Уровень техники

Лечение объемных, рефрактерных видов рака посредством адоптивного переноса инфильтрирующих опухоль лимфоцитов (TIL) представляет собой мощный подход к терапии пациентов с неблагоприятным прогнозом. Gattinoni, et al., Nat. Rev. Immunol. 2006, 6, 383-393. Для успешной иммунотерапии требуется большое количество TIL, а для коммерциализации необходим эффективный и надежный процесс. Это представляло собой непростую задачу из-за технических, логистических и нормативных проблем, связанных с размножением клеток. Размножение TIL на основе IL-2 с последующим "процессом быстрого размножения" (REP) стало предпочтительным способом размножения TIL из-за его скорости и эффективности. Dudley, et al., Science 2002, 298, 850-54; Dudley, et al., J. Clin. Oncol. 2005, 23, 2346-57; Dudley, et al., J. Clin. Oncol. 2008, 26, 5233-39; Riddell, et al., Science 1992, 257, 238-41; Dudley, et al., J. Immunother. 2003, 26, 332-42. REP может привести к 1000-кратному размножению TIL за 14-дневный период, хотя для этого требуется большой избыток (например, 200-кратный) облученных аллогенных мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC, также известных как мононуклеарные клетки (MNC)), часто от нескольких доноров, в качестве питающих клеток, а также антитела к CD3 (OKT3) и высокие дозы IL-2. Dudley, et al., J. Immunother. 2003, 26, 332-42. TIL, подвергшиеся процедуре REP, обеспечили успешную адоптивную клеточную терапию после иммуносупрессии хозяина у пациентов с меланомой.

Краткое описание графических материалов

На фиг. 1 схематично показаны различные этапы лечения пациента посредством адоптивной клеточной терапии с применением TIL, включая различные этапы производства аллогенных TIL.

На фиг. 2A показана временная шкала процесса GEN 3 для производства TIL.

На фиг. 2B показано сравнение процесса 2A и варианта осуществления процесса GEN 3 для производства TIL.

На фиг. 2C показано сравнение варианта осуществления GEN 3, варианта осуществления процесса GEN 3.1 и альтернативного варианта осуществления процесса GEN 3. 1 для производства TIL.

На фиг. 3A показана блок-схема системы координации производства TIL для пациента.

На фиг. 3B показана схема объектов для компонентов системы 300, которые надлежащим образом модифицированы или построены на основе коммерчески доступных программных платформ в дополнение к стандартным компонентам для этих платформ в соответствии с некоторыми вариантами осуществления.

На фиг. 3C-3E схематически показано отслеживание биологического материала в процессе производства на производственном предприятии в соответствии с некоторыми вариантами осуществления.

На фиг. 3F схематически показан процесс поддержания COC и COI на протяжении всего пути продукта клеточной терапии от получения солидной опухоли посредством процесса производства до инфузии в организм пациента в соответствии с некоторыми вариантами осуществления процесса производства (например, процесс GEN 3).

На фиг. 3G представлено репрезентативное изображение этикетки для продукта клеточной терапии в соответствии с некоторыми вариантами осуществления.

На фиг. 3H представлена таблица, показывающая различные типы меток, получаемых в процессе производства продукта клеточной терапии в соответствии с некоторыми вариантами осуществления.

На фиг. 3I и 3J представлены репрезентативные изображения этикетки для готового продукта в соответствии с некоторыми вариантами осуществления.

На фиг. 3K-3P представлены репрезентативные снимки экрана форм получения опухоли в соответствии с некоторыми вариантами осуществления.

На фиг. 4A и 4B показана блок-схема для определения расписания лечебных событий пациента на основе успеха процесса производства TIL.

На фиг. 4C показана блок-схема для альтернативного варианта осуществления для определения расписания лечебных событий пациента на основе успеха процесса производства TIL.

На фиг. 5 показана схема варианта осуществления процесса 2A, 22-дневного процесса производства TIL.

На фиг. 6 показано сравнение процесса 1C и варианта осуществления процесса 2A для производства TIL.

На фиг. 7 представлена хронология процесса 1C.

На фиг. 8 показана подробная схема варианта осуществления процесса 2A.

На фиг. 9 показана иллюстративная схема процесса 2A, дающая обзор этапов от A до F.

На фиг. 10 показана сравнительная таблица этапов от A до F из иллюстративных вариантов осуществления процесса 1C и процесса 2A.

На фиг. 11 показано подробное сравнение варианта осуществления процесса 1C и варианта осуществления процесса 2A.

Краткое описание перечня последовательностей

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

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

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

SEQ ID NO: 4 представляет собой аминокислотную последовательность альдеслейкина.

SEQ ID NO: 5 представляет собой форму IL-2.

SEQ ID NO: 6 представляет собой аминокислотную последовательность немвалейкина альфа.

SEQ ID NO: 7 представляет собой форму IL-2.

SEQ ID NO: 8 представляет собой полипептид с доменом муцина.

SEQ ID NO: 9 представляет собой аминокислотную последовательность рекомбинантного белка IL-4 человека.

SEQ ID NO: 10 представляет собой аминокислотную последовательность рекомбинантного белка IL-7 человека.

SEQ ID NO: 11 представляет собой аминокислотную последовательность рекомбинантного белка IL-15 человека.

SEQ ID NO: 12 представляет собой аминокислотную последовательность рекомбинантного белка IL-21 человека.

SEQ ID NO: 13 представляет собой последовательность IL-2.

SEQ ID NO: 14 представляет собой последовательность мутеина IL-2.

SEQ ID NO: 15 представляет собой последовательность мутеина IL-2.

SEQ ID NO: 16 представляет собой HCDR1IL-2 для IgG.IL2R67A.H1.

SEQ ID NO: 17 представляет собой HCDR2 для IgG.IL2R67A.H1.

SEQ ID NO: 18 представляет собой HCDR3 для IgG.IL2R67A.H1.

SEQ ID NO: 19 представляет собой HCDR1_IL-2 по Kabat для IgG.IL2R67A.H1.

SEQ ID NO: 20 представляет собой HCDR2 по Kabat для IgG.IL2R67A.H1.

SEQ ID NO: 21 представляет собой HCDR3 по Kabat для IgG.IL2R67A.H1.

SEQ ID NO: 22 представляет собой HCDR1_IL-2 по Chothia для IgG.IL2R67A.H1.

SEQ ID NO: 23 представляет собой HCDR2 по Chothia для IgG.IL2R67A.H1.

SEQ ID NO: 24 представляет собой HCDR3 по Chothia для IgG.IL2R67A.H1.

SEQ ID NO: 25 представляет собой IMGT HCDR1_IL-2 для IgG.IL2R67A.H1.

SEQ ID NO: 26 представляет собой IMGT HCDR2 для IgG.IL2R67A.H1.

SEQ ID NO: 27 представляет собой IMGT HCDR3 для IgG.IL2R67A.H1.

SEQ ID NO: 28 представляет собой цепь V_H для IgG.IL2R67A.H1.

SEQ ID NO: 29 представляет собой тяжелую цепь для IgG.IL2R67A.H1.

SEQ ID NO: 30 представляет собой LCDR1 по Kabat для IgG.IL2R67A.H1.

SEQ ID NO: 31 представляет собой LCDR2 по Kabat для IgG.IL2R67A.H1.

SEQ ID NO: 32 представляет собой LCDR3 по Kabat для IgG.IL2R67A.H1.

SEQ ID NO: 33 представляет собой LCDR1 по Chothia для IgG.IL2R67A.H1.

SEQ ID NO: 34 представляет собой LCDR2 по Chothia для IgG.IL2R67A.H1.

SEQ ID NO: 35 представляет собой LCDR3 по Chothia для IgG.IL2R67A.H1.

SEQ ID NO: 36 представляет собой цепь V_L.

SEQ ID NO: 37 представляет собой легкую цепь.

SEQ ID NO: 38 представляет собой легкую цепь.

SEQ ID NO: 39 представляет собой легкую цепь.

SEQ ID NO: 40 представляет собой аминокислотную последовательность 4-1BB человека.

SEQ ID NO: 41 представляет собой аминокислотную последовательность 4-1BB мыши.

SEQ ID NO: 42 представляет собой тяжелую цепь агонистического моноклонального антитела к 4-1BB утомилумаба (PF-05082566).

SEQ ID NO: 43 представляет собой легкую цепь агонистического моноклонального антитела к 4-1BB утомилумаба (PF-05082566).

SEQ ID NO: 44 представляет собой вариабельную область тяжелой цепи (V_H) агонистического моноклонального антитела к 4-1BB утомилумаба (PF-05082566).

SEQ ID NO: 45 представляет собой вариабельную область легкой цепи (V_L) агонистического моноклонального антитела к 4-1BB утомилумаба (PF-05082566).

SEQ ID NO: 46 представляет собой CDR1 тяжелой цепи агонистического моноклонального антитела к 4-1BB утомилумаба (PF-05082566).

SEQ ID NO: 47 представляет собой CDR2 тяжелой цепи агонистического моноклонального антитела к 4-1BB утомилумаба (PF-05082566).

SEQ ID NO: 48 представляет собой CDR3 тяжелой цепи агонистического моноклонального антитела к 4-1BB утомилумаба (PF-05082566).

SEQ ID NO: 49 представляет собой CDR1 легкой цепи агонистического моноклонального антитела

к 4-1BB утомилумаба (PF-05082566).

SEQ ID NO: 50 представляет собой CDR2 легкой цепи агонистического моноклонального антитела к 4-1BB утомилумаба (PF-05082566).

SEQ ID NO: 51 представляет собой CDR3 легкой цепи агонистического моноклонального антитела к 4-1BB утомилумаба (PF-05082566).

SEQ ID NO: 52 представляет собой тяжелую цепь агонистического моноклонального антитела к 4-1BB урелумаба (BMS-663513).

SEQ ID NO: 53 представляет собой легкую цепь агонистического моноклонального антитела к 4-1BB урелумаба (BMS-663513).

SEQ ID NO: 54 представляет собой вариабельную область тяжелой цепи (V_H) агонистического моноклонального антитела к 4-1BB урелумаба (BMS-663513).

SEQ ID NO: 55 представляет собой вариабельную область легкой цепи (V_L) агонистического моноклонального антитела к 4-1BB урелумаба (BMS-663513).

SEQ ID NO: 56 представляет собой CDR1 тяжелой цепи агонистического моноклонального антитела к 4-1BB урелумаба (BMS-663513).

SEQ ID NO: 57 представляет собой CDR2 тяжелой цепи агонистического моноклонального антитела к 4-1BB утомилумаба (BMS-663513).

SEQ ID NO: 58 представляет собой CDR3 тяжелой цепи агонистического моноклонального антитела к 4-1BB урелумаба (BMS-663513).

SEQ ID NO: 59 представляет собой CDR1 легкой цепи агонистического моноклонального антитела к 4-1BB урелумаба (BMS-663513).

SEQ ID NO: 60 представляет собой CDR2 легкой цепи агонистического моноклонального антитела к 4-1BB урелумаба (BMS-663513).

SEQ ID NO: 61 представляет собой CDR3 легкой цепи агонистического моноклонального антитела к 4-1BB урелумаба (BMS-663513).

SEQ ID NO: 62 представляет собой домен Fc слитого белка агониста TNFRSF.

SEQ ID NO: 63 представляет собой линкер слитого белка агониста TNFRSF.

SEQ ID NO: 64 представляет собой линкер слитого белка агониста TNFRSF.

SEQ ID NO: 65 представляет собой линкер слитого белка агониста TNFRSF.

SEQ ID NO: 66 представляет собой линкер слитого белка агониста TNFRSF.

SEQ ID NO: 67 представляет собой линкер для слитого белка агониста TNFRSF.

SEQ ID NO: 68 представляет собой линкер слитого белка агониста TNFRSF.

SEQ ID NO: 69 представляет собой линкер слитого белка агониста TNFRSF.

SEQ ID NO: 70 представляет собой линкер слитого белка агониста TNFRSF.

SEQ ID NO: 71 представляет собой линкер слитого белка агониста TNFRSF.

SEQ ID NO: 72 представляет собой линкер слитого белка агониста TNFRSF.

SEQ ID NO: 73 представляет собой домен Fc слитого белка агониста TNFRSF.

SEQ ID NO: 74 представляет собой линкер слитого белка агониста TNFRSF.

SEQ ID NO: 75 представляет собой линкер слитого белка агониста TNFRSF.

SEQ ID NO: 76 представляет собой линкер слитого белка агониста TNFRSF.

SEQ ID NO: 77 представляет собой аминокислотную последовательность лиганда 4-1BB (4-1BBL).

SEQ ID NO: 78 представляет собой растворимую часть полипептида 4-1BBL.

SEQ ID NO: 79 представляет собой вариабельную область тяжелой цепи (V_H) агонистического антитела к 4-1BB 4B4-1-1 версии 1.

SEQ ID NO: 80 представляет собой вариабельную область легкой цепи (V_L) агонистического антитела к 4-1BB 4B4-1-1 версии 1.

SEQ ID NO: 81 представляет собой вариабельную область тяжелой цепи (V_H) агонистического антитела к 4-1BB 4B4-1-1 версии 2.

SEQ ID NO: 82 представляет собой вариабельную область легкой цепи (V_L) агонистического антитела к 4-1BB 4B4-1-1 версии 2.

SEQ ID NO: 83 представляет собой вариабельную область тяжелой цепи (V_H) агонистического антитела к 4-1BB H39E3-2.

SEQ ID NO: 84 представляет собой вариабельную область легкой цепи (V_L) агонистического антитела к 4-1BB H39E3-2.

SEQ ID NO: 85 представляет собой аминокислотную последовательность OX40 человека.

SEQ ID NO: 86 представляет собой аминокислотную последовательность OX40 мыши.

SEQ ID NO: 87 представляет собой тяжелую цепь агонистического моноклонального антитела к OX40 таволиксизумаба (MEDI-0562).

SEQ ID NO: 88 представляет собой легкую цепь агонистического моноклонального антитела к OX40 таволиксизумаба (MEDI-0562).

SEQ ID NO: 89 представляет собой вариабельную область тяжелой цепи (V_H) агонистического моноклонального антитела к OX40 таволиксизумаба (MEDI-0562).

SEQ ID NO: 90 представляет собой вариабельную область легкой цепи (V_L) агонистического моноклонального антитела к OX40 таволиксизумаба (MEDI-0562).

SEQ ID NO: 91 представляет собой CDR1 тяжелой цепи агонистического моноклонального антитела к OX40 таволиксизумаба (MEDI-0562).

SEQ ID NO: 92 представляет собой CDR2 тяжелой цепи агонистического моноклонального антитела к OX40 таволиксизумаба (MEDI-0562).

SEQ ID NO: 93 представляет собой CDR3 тяжелой цепи агонистического моноклонального антитела к OX40 таволиксизумаба (MEDI-0562).

SEQ ID NO: 94 представляет собой CDR1 легкой цепи агонистического моноклонального антитела к OX40 таволиксизумаба (MEDI-0562).

SEQ ID NO: 95 представляет собой CDR2 легкой цепи агонистического моноклонального антитела к OX40 таволиксизумаба (MEDI-0562).

SEQ ID NO: 96 представляет собой CDR3 легкой цепи агонистического моноклонального антитела к OX40 таволиксизумаба (MEDI-0562).

SEQ ID NO: 97 представляет собой тяжелую цепь агонистического моноклонального антитела к OX40 11D4.

SEQ ID NO: 98 представляет собой легкую цепь агонистического моноклонального антитела к OX40 11D4.

SEQ ID NO: 99 представляет собой вариабельную область тяжелой цепи (V_H) агонистического моноклонального антитела к OX40 11D4.

SEQ ID NO: 100 представляет собой вариабельную область легкой цепи (V_L) агонистического моноклонального антитела к OX40 11D4.

SEQ ID NO: 101 представляет собой CDR1 тяжелой цепи агонистического моноклонального антитела к OX40 11D4.

SEQ ID NO: 102 представляет собой CDR2 тяжелой цепи агонистического моноклонального антитела к OX40 11D4.

SEQ ID NO: 103 представляет собой CDR3 тяжелой цепи агонистического моноклонального антитела к OX40 11D4.

SEQ ID NO: 104 представляет собой CDR1 легкой цепи агонистического моноклонального антитела к OX40 11D4.

SEQ ID NO: 105 представляет собой CDR2 легкой цепи агонистического моноклонального антитела к OX40 11D4.

SEQ ID NO: 106 представляет собой CDR3 легкой цепи агонистического моноклонального антитела к OX40 11D4.

SEQ ID NO: 107 представляет собой тяжелую цепь агонистического моноклонального антитела к OX40 18D8.

SEQ ID NO: 108 представляет собой легкую цепь агонистического моноклонального антитела к OX40 18D8.

SEQ ID NO: 109 представляет собой вариабельную область тяжелой цепи (V_H) агонистического моноклонального антитела к OX40 18D8.

SEQ ID NO: 110 представляет собой вариабельную область легкой цепи (V_L) агонистического моноклонального антитела к OX40 18D8.

SEQ ID NO: 111 представляет собой CDR1 тяжелой цепи агонистического моноклонального антитела к OX40 18D8.

SEQ ID NO: 112 представляет собой CDR2 тяжелой цепи агонистического моноклонального антитела к OX40 18D8.

SEQ ID NO: 113 представляет собой CDR3 тяжелой цепи агонистического моноклонального антитела к OX40 18D8.

SEQ ID NO: 114 представляет собой CDR1 легкой цепи агонистического моноклонального антитела к OX40 18D8.

SEQ ID NO: 115 представляет собой CDR2 легкой цепи агонистического моноклонального антитела к OX40 18D8.

SEQ ID NO: 116 представляет собой CDR3 легкой цепи агонистического моноклонального антитела к OX40 18D8.

SEQ ID NO: 117 представляет собой вариабельную область тяжелой цепи (V_H) агонистического моноклонального антитела к OX40 Hu119-122.

SEQ ID NO: 118 представляет собой вариабельную область легкой цепи (V_L) агонистического моноклонального антитела к OX40 Hu119-122.

SEQ ID NO: 119 представляет собой CDR1 тяжелой цепи агонистического моноклонального антитела к OX40 Hu119-122.

SEQ ID NO: 120 представляет собой CDR2 тяжелой цепи агонистического моноклонального антитела к OX40 Hu119-122.

SEQ ID NO: 121 представляет собой CDR3 тяжелой цепи агонистического моноклонального антитела к OX40 Hu119-122.

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

SEQ ID NO: 123 представляет собой CDR2 легкой цепи агонистического моноклонального антитела к OX40 Hu119-122.

SEQ ID NO: 124 представляет собой CDR3 легкой цепи агонистического моноклонального антитела к OX40 Hu119-122.

SEQ ID NO: 125 представляет собой вариабельную область тяжелой цепи (V_H) агонистического моноклонального антитела к OX40 Hu106-222.

SEQ ID NO: 126 представляет собой вариабельную область легкой цепи (V_L) агонистического моноклонального антитела к OX40 Hu106-222.

SEQ ID NO: 127 представляет собой CDR1 тяжелой цепи агонистического моноклонального антитела к OX40 Hu106-222.

SEQ ID NO: 128 представляет собой CDR2 тяжелой цепи агонистического моноклонального антитела к OX40 Hu106-222.

SEQ ID NO: 129 представляет собой CDR3 тяжелой цепи агонистического моноклонального антитела к OX40 Hu106-222.

SEQ ID NO: 130 представляет собой CDR1 легкой цепи агонистического моноклонального антитела к OX40 Hu106-222.

SEQ ID NO: 131 представляет собой CDR2 легкой цепи агонистического моноклонального антитела к OX40 Hu106-222.

SEQ ID NO: 132 представляет собой CDR3 легкой цепи агонистического моноклонального антитела к OX40 Hu106-222.

SEQ ID NO: 133 представляет собой аминокислотную последовательность лиганда OX40 (OX40L).

SEQ ID NO: 134 представляет собой растворимую часть полипептида OX40L.

SEQ ID NO: 135 представляет собой альтернативную растворимую часть полипептида OX40L.

SEQ ID NO: 136 представляет собой вариабельную область тяжелой цепи (V_H) агонистического моноклонального антитела к OX40 008.

SEQ ID NO: 137 представляет собой вариабельную область легкой цепи (V_L) агонистического моноклонального антитела к OX40 008.

SEQ ID NO: 138 представляет собой вариабельную область тяжелой цепи (V_H) агонистического моноклонального антитела к OX40 011.

SEQ ID NO: 139 представляет собой вариабельную область легкой цепи (V_L) агонистического моноклонального антитела к OX40 011.

SEQ ID NO: 140 представляет собой вариабельную область тяжелой цепи (V_H) агонистического моноклонального антитела к OX40 021.

SEQ ID NO: 141 представляет собой вариабельную область легкой цепи (V_L) агонистического моноклонального антитела к OX40 021.

SEQ ID NO: 142 представляет собой вариабельную область тяжелой цепи (V_H) агонистического моноклонального антитела к OX40 023.

SEQ ID NO: 143 представляет собой вариабельную область легкой цепи (V_L) агонистического моноклонального антитела к OX40 023.

SEQ ID NO: 144 представляет собой вариабельную область тяжелой цепи (V_H) агонистического моноклонального антитела к OX40.

SEQ ID NO: 145 представляет собой вариабельную область легкой цепи (V_L) агонистического моноклонального антитела к OX40.

SEQ ID NO: 146 представляет собой вариабельную область тяжелой цепи (V_H) агонистического моноклонального антитела к OX40.

SEQ ID NO: 147 представляет собой вариабельную область легкой цепи (V_L) агонистического моноклонального антитела к OX40.

SEQ ID NO: 148 представляет собой вариабельную область тяжелой цепи (V_H) гуманизированного агонистического моноклонального антитела к OX40.

SEQ ID NO: 149 представляет собой вариабельную область тяжелой цепи (V_H) гуманизированного агонистического моноклонального антитела к OX40.

SEQ ID NO: 150 представляет собой вариабельную область легкой цепи (V_L) гуманизированного агонистического моноклонального антитела к OX40.

SEQ ID NO: 151 представляет собой вариабельную область легкой цепи (V_L) гуманизированного агонистического моноклонального антитела к OX40.

SEQ ID NO: 152 представляет собой вариабельную область тяжелой цепи (V_H) гуманизированного агонистического моноклонального антитела к OX40.

SEQ ID NO: 153 представляет собой вариабельную область тяжелой цепи (V_H) гуманизированного

агонистического моноклонального антитела к OX40.

SEQ ID NO: 154 представляет собой вариабельную область легкой цепи (V_L) гуманизированного агонистического моноклонального антитела к OX40.

SEQ ID NO: 155 представляет собой вариабельную область легкой цепи (V_L) гуманизированного агонистического моноклонального антитела к OX40.

SEQ ID NO: 156 представляет собой вариабельную область тяжелой цепи (V_H) агонистического моноклонального антитела к OX40.

SEQ ID NO: 157 представляет собой вариабельную область легкой цепи (V_L) агонистического моноклонального антитела к OX40.

SEQ ID NO: 158 представляет собой аминокислотную последовательность тяжелой цепи ниволумаба, ингибитора PD-1.

SEQ ID NO: 159 представляет собой аминокислотную последовательность легкой цепи ниволумаба, ингибитора PD-1.

SEQ ID NO: 160 представляет собой аминокислотную последовательность вариабельной области тяжелой цепи (V_H) ниволумаба, ингибитора PD-1.

SEQ ID NO: 161 представляет собой аминокислотную последовательность вариабельной области легкой цепи (V_L) ниволумаба, ингибитора PD-1.

SEQ ID NO: 162 представляет собой аминокислотную последовательность CDR1 тяжелой цепи ниволумаба, ингибитора PD-1.

SEQ ID NO: 163 представляет собой аминокислотную последовательность CDR2 тяжелой цепи ниволумаба, ингибитора PD-1.

SEQ ID NO: 164 представляет собой аминокислотную последовательность CDR3 тяжелой цепи ниволумаба, ингибитора PD-1.

SEQ ID NO: 165 представляет собой аминокислотную последовательность CDR1 легкой цепи ниволумаба, ингибитора PD-1.

SEQ ID NO: 166 представляет собой аминокислотную последовательность CDR2 легкой цепи ниволумаба, ингибитора PD-1.

SEQ ID NO: 167 представляет собой аминокислотную последовательность CDR3 легкой цепи ниволумаба, ингибитора PD-1.

SEQ ID NO: 168 представляет собой аминокислотную последовательность тяжелой цепи пембролизумаба, ингибитора PD-1.

SEQ ID NO: 169 представляет собой аминокислотную последовательность легкой цепи пембролизумаба, ингибитора PD-1.

SEQ ID NO: 170 представляет собой аминокислотную последовательность вариабельной области тяжелой цепи (V_H) пембролизумаба, ингибитора PD-1.

SEQ ID NO: 171 представляет собой аминокислотную последовательность вариабельной области легкой цепи (V_L) пембролизумаба, ингибитора PD-1.

SEQ ID NO: 172 представляет собой аминокислотную последовательность CDR1 тяжелой цепи пембролизумаба, ингибитора PD-1.

SEQ ID NO: 173 представляет собой аминокислотную последовательность CDR2 тяжелой цепи пембролизумаба, ингибитора PD-1.

SEQ ID NO: 174 представляет собой аминокислотную последовательность CDR3 тяжелой цепи пембролизумаба, ингибитора PD-1.

SEQ ID NO: 175 представляет собой аминокислотную последовательность CDR1 легкой цепи пембролизумаба, ингибитора PD-1.

SEQ ID NO: 176 представляет собой аминокислотную последовательность CDR2 легкой цепи пембролизумаба, ингибитора PD-1.

SEQ ID NO: 177 представляет собой аминокислотную последовательность CDR3 легкой цепи пембролизумаба, ингибитора PD-1.

SEQ ID NO: 178 представляет собой аминокислотную последовательность тяжелой цепи дурвалумаба, ингибитора PD-L1.

SEQ ID NO: 179 представляет собой аминокислотную последовательность легкой цепи дурвалумаба, ингибитора PD-L1.

SEQ ID NO: 180 представляет собой аминокислотную последовательность вариабельной области тяжелой цепи (V_H) дурвалумаба, ингибитора PD-L1.

SEQ ID NO: 181 представляет собой аминокислотную последовательность вариабельной области легкой цепи (V_L) дурвалумаба, ингибитора PD-L1.

SEQ ID NO: 182 представляет собой аминокислотную последовательность CDR1 тяжелой цепи дурвалумаба, ингибитора PD-L1.

SEQ ID NO: 183 представляет собой аминокислотную последовательность CDR2 тяжелой цепи дурвалумаба, ингибитора PD-L1.

SEQ ID NO: 184 представляет собой аминокислотную последовательность CDR3 тяжелой цепи дур-

валумаба, ингибитора PD-L1.

SEQ ID NO: 185 представляет собой аминокислотную последовательность CDR1 легкой цепи дурвалумаба, ингибитора PD-L1.

SEQ ID NO: 186 представляет собой аминокислотную последовательность CDR2 легкой цепи дурвалумаба, ингибитора PD-L1.

SEQ ID NO: 187 представляет собой аминокислотную последовательность CDR3 легкой цепи дурвалумаба, ингибитора PD-L1.

SEQ ID NO: 188 представляет собой аминокислотную последовательность тяжелой цепи авелумаба, ингибитора PD-L1.

SEQ ID NO: 189 представляет собой аминокислотную последовательность легкой цепи авелумаба, ингибитора PD-L1.

SEQ ID NO: 190 представляет собой аминокислотную последовательность вариабельной области тяжелой цепи (V_H) авелумаба, ингибитора PD-L1.

SEQ ID NO: 191 представляет собой аминокислотную последовательность вариабельной области легкой цепи (V_L) авелумаба, ингибитора PD-L1.

SEQ ID NO: 192 представляет собой аминокислотную последовательность CDR1 тяжелой цепи авелумаба, ингибитора PD-L1.

SEQ ID NO: 193 представляет собой аминокислотную последовательность CDR2 тяжелой цепи авелумаба, ингибитора PD-L1.

SEQ ID NO: 194 представляет собой аминокислотную последовательность CDR3 тяжелой цепи авелумаба, ингибитора PD-L1.

SEQ ID NO: 195 представляет собой аминокислотную последовательность CDR1 легкой цепи авелумаба, ингибитора PD-L1.

SEQ ID NO: 196 представляет собой аминокислотную последовательность CDR2 легкой цепи авелумаба, ингибитора PD-L1.

SEQ ID NO: 197 представляет собой аминокислотную последовательность CDR3 легкой цепи авелумаба, ингибитора PD-L1.

SEQ ID NO: 198 представляет собой аминокислотную последовательность тяжелой цепи атезолизумаба, ингибитора PD-L1.

SEQ ID NO: 199 представляет собой аминокислотную последовательность легкой цепи атезолизумаба, ингибитора PD-L1.

SEQ ID NO: 200 представляет собой аминокислотную последовательность вариабельной области тяжелой цепи (V_H) атезолизумаба, ингибитора PD-L1.

SEQ ID NO: 201 представляет собой аминокислотную последовательность вариабельной области легкой цепи (V_L) атезолизумаба, ингибитора PD-L1.

SEQ ID NO: 202 представляет собой аминокислотную последовательность CDR1 тяжелой цепи атезолизумаба, ингибитора PD-L1.

SEQ ID NO: 203 представляет собой аминокислотную последовательность CDR2 тяжелой цепи атезолизумаба, ингибитора PD-L1.

SEQ ID NO: 204 представляет собой аминокислотную последовательность CDR3 тяжелой цепи атезолизумаба, ингибитора PD-L1.

SEQ ID NO: 205 представляет собой аминокислотную последовательность CDR1 легкой цепи атезолизумаба, ингибитора PD-L1.

SEQ ID NO: 206 представляет собой аминокислотную последовательность CDR2 легкой цепи атезолизумаба, ингибитора PD-L1.

SEQ ID NO: 207 представляет собой аминокислотную последовательность CDR3 легкой цепи атезолизумаба, ингибитора PD-L1.

SEQ ID NO: 208 представляет собой аминокислотную последовательность тяжелой цепи ипилимумаба, ингибитора CTLA-4.

SEQ ID NO: 209 представляет собой аминокислотную последовательность легкой цепи ипилимумаба, ингибитора CTLA-4.

SEQ ID NO: 210 представляет собой аминокислотную последовательность вариабельной области тяжелой цепи (V_H) ипилимумаба, ингибитора CTLA-4.

SEQ ID NO: 211 представляет собой аминокислотную последовательность вариабельной области легкой цепи (V_L) ипилимумаба, ингибитора CTLA-4.

SEQ ID NO: 212 представляет собой аминокислотную последовательность CDR1 тяжелой цепи ипилимумаба, ингибитора CTLA-4.

SEQ ID NO: 213 представляет собой аминокислотную последовательность CDR2 тяжелой цепи ипилимумаба, ингибитора CTLA-4.

SEQ ID NO: 214 представляет собой аминокислотную последовательность CDR3 тяжелой цепи ипилимумаба, ингибитора CTLA-4.

SEQ ID NO: 215 представляет собой аминокислотную последовательность CDR1 легкой цепи ипи-

лимумаба, ингибитора CTLA-4.

SEQ ID NO: 216 представляет собой аминокислотную последовательность CDR2 легкой цепи ипилимумаба, ингибитора CTLA-4.

SEQ ID NO: 217 представляет собой аминокислотную последовательность CDR3 легкой цепи ипилимумаба, ингибитора CTLA-4.

SEQ ID NO: 218 представляет собой аминокислотную последовательность тяжелой цепи тремелимумаба, ингибитора CTLA-4.

SEQ ID NO: 219 представляет собой аминокислотную последовательность легкой цепи тремелимумаба, ингибитора CTLA-4.

SEQ ID NO: 220 представляет собой аминокислотную последовательность вариабельной области тяжелой цепи (V_H) тремелимумаба, ингибитора CTLA-4.

SEQ ID NO: 221 представляет собой аминокислотную последовательность вариабельной области легкой цепи (V_L) тремелимумаба, ингибитора CTLA-4.

SEQ ID NO: 222 представляет собой аминокислотную последовательность CDR1 тяжелой цепи тремелимумаба, ингибитора CTLA-4.

SEQ ID NO: 223 представляет собой аминокислотную последовательность CDR2 тяжелой цепи тремелимумаба, ингибитора CTLA-4.

SEQ ID NO: 224 представляет собой аминокислотную последовательность CDR3 тяжелой цепи тремелимумаба, ингибитора CTLA-4.

SEQ ID NO: 225 представляет собой аминокислотную последовательность CDR1 легкой цепи тремелимумаба, ингибитора CTLA-4.

SEQ ID NO: 226 представляет собой аминокислотную последовательность CDR2 легкой цепи тремелимумаба, ингибитора CTLA-4.

SEQ ID NO: 227 представляет собой аминокислотную последовательность CDR3 легкой цепи тремелимумаба, ингибитора CTLA-4.

SEQ ID NO: 228 представляет собой аминокислотную последовательность тяжелой цепи залифрелимаба, ингибитора CTLA-4.

SEQ ID NO: 229 представляет собой аминокислотную последовательность легкой цепи залифрелимаба, ингибитора CTLA-4.

SEQ ID NO: 230 представляет собой аминокислотную последовательность вариабельной области тяжелой цепи (V_H) залифрелимаба, ингибитора CTLA-4.

SEQ ID NO: 231 представляет собой аминокислотную последовательность вариабельной области легкой цепи (V_L) залифрелимаба, ингибитора CTLA-4.

SEQ ID NO: 232 представляет собой аминокислотную последовательность CDR1 тяжелой цепи залифрелимаба, ингибитора CTLA-4.

SEQ ID NO: 233 представляет собой аминокислотную последовательность CDR2 тяжелой цепи залифрелимаба, ингибитора CTLA-4.

SEQ ID NO: 234 представляет собой аминокислотную последовательность CDR3 тяжелой цепи залифрелимаба, ингибитора CTLA-4.

SEQ ID NO: 235 представляет собой аминокислотную последовательность CDR1 легкой цепи залифрелимаба, ингибитора CTLA-4.

SEQ ID NO: 236 представляет собой аминокислотную последовательность CDR2 легкой цепи залифрелимаба, ингибитора CTLA-4.

SEQ ID NO: 237 представляет собой аминокислотную последовательность CDR3 легкой цепи залифрелимаба, ингибитора CTLA-4.

Подробное описание сущности изобретения

I. Введение.

Адоптивная клеточная терапия с применением TIL, культивированных с помощью протокола быстрого размножения (REP), привела к успешной адоптивной клеточной терапии после иммуносупрессии хозяина у пациентов с меланомой. Например, было обнаружено, что в некоторых случаях лимфодеплеция до адоптивного переноса опухолеспецифических Т-лимфоцитов играет ключевую роль в повышении эффективности лечения за счет устранения регуляторных Т-клеток и конкурирующих элементов иммунной системы ("цитокиновые осадки"). В некоторых случаях эффективность АКТ может быть повышена за счет предварительного лечения пациента, получающего АКТ, немиелоаблативной химиотерапией до инфузии TIL, например, за 28-25 дней до инфузии TIL. Также было обнаружено, что схема лечения IL-2 после инфузии TIL может улучшить шансы на успех терапии. Время и продолжительность этих процедур до и после инфузии определяют конечную эффективность всей схемы лечения.

Таким образом, планирование различных схем лечения зависит от сроков и продолжительности производственного процесса TIL, который сам по себе зависит от параметров приемлемости конечного продукта. Текущие параметры приемлемости инфузии зависят от показаний состава TIL (например, позитивность CD28, CD8 или CD4), а также от кратности размножения и жизнеспособности размноженного продукта TIL (также называемого в настоящем документе продуктом REP). В свою очередь, кратность

размножения и жизнеспособность продукта REP зависят от различных параметров, измеряемых в процессе размножения. Такие различия в выходе и сроках получения приемлемого продукта REP для инфузии создают проблемы с логистикой транспортировки опухоли на производственное предприятие, переносом продукта REP и планированием различных лечебных событий пациента в процессе производства TIL.

Кроме того, различные параметры, такие как жизнеспособность клеток и количество клеток на разных этапах процесса производства TIL, определяют продолжительность последующих этапов, так что в конце процесса производства TIL получают приемлемые показатели жизнеспособности, числовой кратности и окончательного количества клеток.

Кроме того, важно отслеживать биологический материал с момента его извлечения из пациента до момента его инфузии в организм пациента, в том числе на протяжении всего процесса производства TIL, чтобы избежать задержек производства, неправильной маркировки материала и неправильной идентификации пациента, тем самым повышая безопасность пациента.

Настоящее изобретение обеспечивает основу для координации процесса производства размноженного продукта клеточной терапии для пациента и различных лечебных событий пациента путем динамического планирования различных лечебных событий пациента на основе различных измеренных параметров на разных этапах процесса производства.

Например, в одном варианте осуществления способ координации производства размноженных Т-клеток для пациента может включать в себя получение посредством вычисления запроса на заказ клеток для размножения Т-клеток для пациента; создание посредством вычислительного устройства специфичного для пациента идентификатора или идентификатора заказа клеток, связанного с запросом на заказ клеток; и инициирование процесса размножения Т-клеток. Процесс размножения Т-клеток может включать проведение в лечебном учреждении процедуры на пациенте для получения Т-клеток от пациента и перенос полученных Т-клеток на производственное предприятие. После получения полученных Т-клеток на производственном предприятии лечебные события пациента динамически планируются посредством вычислительного устройства. Динамическое планирование зависит от параметров приемлемости у впоследствии полученных Т-клетках размножения. Инициируют размножение Т-клеток по меньшей мере из некоторых из полученных Т-клеток с помощью методики размножения клеток и определяют параметры приемлемости у Т-клеток размножения.

В другом варианте осуществления способ координации производства размноженного продукта клеточной терапии для пациента может включать в себя прием посредством вычислительного устройства запроса на заказ клеток для размножения продукта клеточной терапии для пациента; создание посредством вычислительного устройства специфичного для пациента идентификатора, включающего в себя идентификатор заказа клеток, связанный с запросом на заказ клеток; и инициирование процесса размножения продукта клеточной терапии. Процесс размножения продукта клеточной терапии может включать выполнение в лечебном учреждении процедуры на пациенте для получения солидной опухоли от пациента и перенос полученной солидной опухоли на производственное предприятие. После получения солидной опухоли на производственном предприятии лечебные события пациента динамически планируются посредством вычислительного устройства. Динамическое планирование зависит от параметров приемлемости впоследствии полученного размноженного продукта клеточной терапии. Инициируют размножение продукта клеточной терапии из по меньшей мере части полученной солидной опухоли с помощью методики размножения клеток, и определяют параметры приемлемости размноженного продукта клеточной терапии в первый момент времени и во второй момент времени, следующий за первым моментом времени. Определяют, соответствуют ли параметры приемлемости размноженного продукта клеточной терапии определенным критериям приемлемости в первый момент времени и во второй момент времени. Если параметры приемлемости в первый момент времени соответствуют критериям приемлемости, размножение продукта клеточной терапии продолжают вплоть до второго момента времени. Если параметры приемлемости размноженного продукта клеточной терапии не соответствуют критериям приемлемости во второй момент времени, определяют, возможно ли повторное выполнение размножения продукта клеточной терапии с помощью методики размножения клеток с первого момента времени на основе параметров приемлемости во второй момент времени. Если определено, что повторное размножение возможно, выполняют размножение продукта клеточной терапии из по меньшей мере некоторого количества продукта клеточной терапии, полученного во второй момент времени, с помощью методики размножения клеток из первого момента времени. Оценивают время завершения размножения продукта клеточной терапии после повторного выполнения размножения продукта клеточной терапии с первого момента времени. Расписание лечебных событий пациента изменяют на основании расчетного времени завершения размножения продукта клеточной терапии и времени лечебных событий до или после инфузии размноженного продукта клеточной терапии в организм пациента. Последующее размножение продукта клеточной терапии завершают с первого момента времени.

Настоящее изобретение дополнительно обеспечивает способы и системы для точного отслеживания биологического материала с момента его извлечения из организма пациента до момента его повторной инфузии в организм пациента. В частности, способы и системы, описанные в настоящем документе, об-

легчают поддержание цепочки идентификации и цепочки ответственности для биологического материала.

Например, в одном варианте осуществления способ отслеживания биологического материала пациента может включать в себя получение запроса на заказ клеток для изготовления биологического материала для пациента. При получении запроса на заказ клеток вычислительное устройство генерирует специфичный для пациента идентификатор, связанный с запросом на заказ клеток. Специфичный для пациента идентификатор может включать в себя один или более из идентификатора пациента, идентификатора запроса на заказ клеток, кода заказа и номера партии заказа клеток. Биологический материал пациента затем отслеживают во время доставки биологического материала из клинического учреждения, где биологический материал извлекают из организма пациента, на производственное предприятие, на производственном предприятии во время процесса производства и во время доставки изготовленного биологического материала с производственного предприятия в клиническое учреждение, где находится изготовленный биологический материал, и обратно в клиническое учреждение, где пациенту выполняют инфузию изготовленного биологического материала с применением специфичного для пациента идентификатора. Отслеживание может включать в себя запись посредством вычислительного устройства события отслеживания на каждом этапе процессов доставки и производства. Запись событий отслеживания включает в себя цепочку хранения биологического материала пациента.

Если не указано иное, все технические и научные термины, применяемые в настоящем документе, имеют то же значение, которое обычно понимается специалистом в области, к которой принадлежит настоящее изобретение. Все патенты и публикации, упоминаемые в данном документе, в полном объеме включены в настоящий документ посредством ссылки.

Термин "in vivo" относится к событию, происходящему в организме субъекта.

Термин "in vitro" относится к событию, происходящему вне организма субъекта. Анализы in vitro охватывают клеточные анализы, в которых применяют живые или мертвые клетки, а также могут включать бесклеточный анализ, в котором не применяются интактные клетки.

Термин "ex vivo" относится к событию, которое включает лечение или выполнение процедуры на клетке, ткани и/или органе, которые были удалены из организма субъекта. Соответственно, клетка, ткань и/или орган могут быть возвращены в организм субъекта хирургическим путем или способом лечения.

Термин "быстрое размножение" означает увеличение количества антигенспецифических TIL в по меньшей мере около 3 раза (или в 4, 5, 6, 7, 8 или 9 раз) в течение недели, более предпочтительно в по меньшей мере около 10 раз (или в 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 или 90 раз) в течение недели или, наиболее предпочтительно, в по меньшей мере около 100 раз в течение недели. Ниже представлен ряд протоколов быстрого размножения.

Под термином "инфильтрирующие опухоль лимфоциты" или "TIL" в настоящем документе подразумевается популяция клеток, первоначально полученных в виде белых кровяных клеток, которые покинули кровоток субъекта и мигрировали в опухоль. TIL включают, помимо прочего, цитотоксические Т-клетки $CD8^+$ (лимфоциты), Т-клетки Th1 и Th7 $CD4^+$, естественные клетки-киллеры, дендритные клетки и макрофаги M1. TIL включают как первичные, так и вторичные TIL. "Первичные TIL" - это те TIL, которые получены из образцов тканей пациента, как указано в настоящем документе (иногда называемые "свежеполученными" или "свежевыделенными"), а "вторичные TIL" - это любые популяции клеток TIL, которые были размножены или пролиферированы, как описано в настоящем документе, включая, помимо прочего, суммарные TIL и размноженные TIL ("REP TIL" или "post-REP TIL"). Популяции клеток TIL могут включать генетически модифицированные TIL.

Под "популяцией клеток" (включая TIL) в настоящем документе подразумевается ряд клеток, которые имеют общие признаки. В целом популяции обычно варьируются от 1×10^6 до 1×10^{10}, при этом разные популяции TIL включают разные количества. Например, начальный рост первичных TIL в присутствии IL-2 приводит к получению популяции суммарных TIL в количестве примерно 1×10^8 клеток. Размножение REP обычно проводят для обеспечения популяций от $1{,}5 \times 10^9$ до $1{,}5 \times 10^{10}$ клеток для инфузии. В некоторых вариантах осуществления размножение REP выполняют для обеспечения популяций от $2{,}3 \times 10^{10}$ до $13{,}7 \times 10^{10}$.

Под "криоконсервированными TIL" в настоящем документе подразумевается, что TIL, либо первичные, основные, либо размноженные (REP TIL), обрабатывают и хранят в диапазоне от около -150°C до -60°C. Общие способы криоконсервации также описаны в другом месте настоящего документа, в том числе в примерах. Для ясности "криоконсервированные TIL" отличаются от образцов замороженных тканей, которые можно применять в качестве источника первичных TIL.

Под "размороженными криоконсервированными TIL" в настоящем подразумевается популяция TIL, которая ранее была криоконсервирована, а затем обработана для возвращения к комнатной температуре или выше, включая, помимо прочего, температуры клеточной культуры или температуры, при которых TIL можно вводить пациенту.

TIL обычно можно определить либо биохимически, используя маркеры клеточной поверхности, либо функционально, по их способности проникать в опухоли и влиять на лечение. TIL обычно можно

классифицировать по экспрессии одного или более из следующих биомаркеров: CD4, CD8, TCR ap, CD27, CD28, CD56, CCR7, CD45Ra, CD95, PD-1 и CD25. Дополнительно, и альтернативно, TIL можно функционально определить инфильтрировать ли солидные опухоли при повторном введении пациенту.

Термин "среды для криоконсервации" или "среда для криоконсервации" относится к любой среде, которую можно применять для криоконсервации клеток. Такие среды могут включать среды, содержащие от 7% до 10% ДМСО. Иллюстративные среды включают CryoStor CS10, Hyperthermasol, а также их комбинации. Термин "CS10" относится к среде для криоконсервации, полученной от компании Stemcell Technologies или Biolife Solutions.

Среда CS10 может упоминаться под торговым наименованием "CryoStor® CS10". Среда CS10 представляет собой бессывороточную среду, не содержащую животных компонентов, которая содержит ДМСО.

Термин "центральная Т-клетка памяти" относится к подмножеству Т-клеток, которые у человека представляют собой $CD45R0^{+}$ и конститутивно экспрессируют CCR7 ($CCR7^{hi}$) и CD62L ($CD62^{hi}$). Поверхностный фенотип центральных Т-клеток памяти также включает TCR, CD3, CD127 (IL-7R) и IL-15R. Факторы транскрипции для центральных Т-клеток памяти включают BCL-6, BCL-6B, MBD2 и BMI1. Центральные Т-клетки памяти в первую очередь секретируют IL-2 и CD40L в качестве эффекторных молекул после запуска TCR. Центральные Т-клетки памяти преобладают в компартменте CD4 в крови, а у человека их пропорционально больше в лимфатических узлах и миндалинах.

Термин "эффекторные Т-клетки памяти" относится к подмножеству Т-клеток человека или млекопитающих, которые, как и центральные Т-клетки памяти, являются $CD45R0^{+}$, но потеряли конститутивную экспрессию CCR7 ($CCR7^{lo}$) и являются гетерогенными или низкими по экспрессии CD62L ($CD62L^{lo}$). Поверхностный фенотип центральных Т-клеток памяти также включает TCR, CD3, CD127 (IL-7R) и IL-15R. Факторы транскрипции для центральных Т-клеток памяти включают BLIMP1. Эффекторные Т-клетки памяти быстро секретируют высокие уровни воспалительных цитокинов после антигенной стимуляции, включая интерферон-у, IL-4 и IL-5. Эффекторные Т-клетки памяти преобладают в компартменте CD8 в крови, а у человека их пропорционально больше в легких, печени и кишечнике. Эффекторные Т-клетки памяти $CD8^{+}$ несут большое количество перфорина.

Термин "закрытая система" относится к системе, которая закрыта для внешней среды. Любая закрытая система, подходящая для способов культивирования клеток, может быть применена со способами по настоящему изобретению. Закрытые системы включают, помимо прочего, например, закрытые G-контейнеры. Как только сегмент опухоли добавлен в закрытую систему, система не открывается для внешней среды до тех пор, пока TIL не будут готовы для введения пациенту.

Термины "фрагментация", "фрагментировать" и "фрагментированный", применяемые в настоящем документе для описания процессов разрушения опухоли, включают способы механической фрагментации, такие как дробление, разрезание, деление и морцелляцию опухолевой ткани, а также любой другой способ разрушения физической структуры опухолевой ткани.

Термин "тонкоигольная аспирация" или FNA относится к типу процедуры биопсии, которую можно применять для взятия образцов или диагностических процедур, включая взятие образцов опухоли, при которых образец берется, но опухоль не удаляется или не резецируется. При тонкоигольной аспирации полую иглу, например, калибра 25-18, вводят в опухоль или в область, содержащую опухоль, и получают жидкость и клетки (включая ткани) для дальнейшего анализа или размножения, как описано в настоящем документе. При FNA клетки удаляют без сохранения гистологической архитектуры клеток тканей.

FNA может содержать TIL. В некоторых случаях тонкоигольную аспирационную биопсию выполняют с помощью иглы для тонкоигольной аспирационной биопсии под ультразвуковым контролем. Иглы FNA коммерчески доступны от компании Becton Dickinson, Covidien и т.п.

Термин "толстоигольная биопсия" или "пункционная биопсия" относится к типу процедуры биопсии, которую можно применять для взятия образцов или диагностических процедур, включая взятие образцов опухоли, при которых образец берется, но опухоль не удаляется или не резецируется. При толстоигольной биопсии полую иглу, например, калибра 16-11, вводят в опухоль или в область, содержащую опухоль, и получают жидкость и клетки (включая ткани) для дальнейшего анализа или размножения, как описано в настоящем документе. При толстоигольной биопсии клетки могут быть удалены с некоторым сохранением гистологической архитектуры клеток тканей, учитывая больший размер иглы в сравнении с FNA. Игла для толстоигольной биопсии обычно имеет такой размер, который позволяет сохранить по крайней мере часть гистологической архитектуры опухоли. Толстоигольная биопсия может содержать TIL. В некоторых случаях толстоигольную биопсию выполняют с помощью инструмента для биопсии, вакуумного инструмента для толстоигольной биопсии, стереотаксического инструмента для толстоигольной биопсии, инструмента для толстоигольной биопсии под ультразвуковым контролем, инструмента для толстоигольной биопсии под контролем МРТ, коммерчески доступных от компании Bard Medical, Becton Dickinson и т.п.

Термины "мононуклеарные клетки периферической крови" и "PBMC" относятся к клетке периферической крови, имеющей круглое ядро, включая лимфоциты (Т-клетки, В-клетки, NK-клетки) и моноциты. При использовании в качестве антигенпрезентирующих клеток (PBMC представляют собой тип

антигенпрезентирующих клеток) мононуклеарные клетки периферической крови представляют собой облученные аллогенные мононуклеарные клетки периферической крови.

Термины "лимфоциты периферической крови" и "PBL" относятся к Т-клеткам, размножающимся из периферической крови. В некоторых вариантах осуществления PBL выделяют из цельной крови или продукта афереза донора. В некоторых вариантах осуществления PBL выделяют из цельной крови или продукта афереза донора путем положительной или отрицательной селекции Т-клеточного фенотипа, такого как Т-клеточный фенотип $CD3^+$ $CD45^+$.

Термин "антитело к CD3" относится к антителу или его варианту, например, моноклональному антителу, включая человеческие, гуманизированные, химерные или мышиные антитела, которые направлены против рецептора CD3 в рецепторе Т-клеточного антигена зрелых Т-клеток. Антитела к CD3 включают ОКТ-3, также известный как муромонаб. Антитела к CD3 также включают клон UHCT1, также известный как Т3 и CD3ε. Другие антитела к CD3 включают, например, отеликсизумаб, теплизумаб и визилизумаб.

Термин "ОКТ-3" (также называемый в данном документе как "ОКТ3") относится к моноклональному антителу или его биоаналогу или варианту, включая человеческие, гуманизированные, химерные или мышиные антитела, направленные против рецептора CD3 в рецепторе Т-клеточного антигена зрелых Т-клеток и включает коммерчески доступные формы, такие как ОКТ-3 (30 нг/мл, чистый MACS GMP CD3, Miltenyi Biotech, Inc., Сан-Диего, Калифорния, США) и муромонаб или его варианты, консервативные аминокислотные замены, гликоформы или биоаналоги. Аминокислотные последовательности тяжелой и легкой цепей муромонаба приведены в табл. 1 (SEQ ID NO: 1 и SEQ ID NO: 2). Гибридома, способная продуцировать ОКТ-3, депонирована в Американской коллекции типовых культур, и ей присвоен общедоступный номер ATCC CRL 8001. Гибридома, способная продуцировать ОКТ-3, также депонирована в Европейской коллекции аутентифицированных клеточных культур (ECACC) и ей присвоен каталожный номер 86022706.

Таблица 1

Аминокислотные последовательности муромонаба

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

Термин "IL-2" (также называемый в настоящем документе "IL2") относится к фактору роста Т-клеток, известному как интерлейкин-2, и включает все формы IL-2, включая формы человека и млекопитающих, консервативные аминокислотные замены, гликоформы, биоаналоги и их варианты. IL-2 описан, например, в публикации Nelson, J. Immunol. 2004, 172, 3983-88 и публикации Malek, Annu. Rev. Immunol. 2008, 26, 453-79, описание которых включено в настоящий документ посредством ссылки. Аминокислотная последовательность рекомбинантного человеческого IL-2, подходящая для применения в настоящем изобретении, представлена в табл. 2 (SEQ ID NO: 3). Например, термин IL-2 включает человеческие рекомбинантные формы IL-2, такие как альдеслейкин (ПРОЛЕЙКИН, коммерчески доступный от нескольких поставщиков в дозировке 22 миллиона МЕ в одноразовых флаконах), а также форму рекомбинантного IL-2, коммерчески поставляемую, компанией CellGenix, Inc., Портсмут, штат Нью-Гемпшир, США (CELLGRO GMP) или ProSpec-Tany TechnoGene Ltd., Ист-Брансуик, штат Нью-Джерси, США (кат. № CYT-209-b) и другие коммерческие аналоги от других поставщиков. Альдеслейкин (дес-аланил-1, серии-125 человеческого IL-2) представляет собой негликозилированную рекомбинантную форму человеческого IL-2 с молекулярной массой около 15 кДа. Аминокислотная последовательность альдеслейкина, подходящая для применения в настоящем изобретении, представлена в табл. 2 (SEQ ID NO: 4). Термин IL-2 также охватывает пегилированные формы IL-2, как описано в настоящем документе, включая пегилированное пролекарство IL2 бемпегальдеслейкин (NKTR-214, пегилированный человеческий рекомбинантный IL-2, как в SEQ ID NO: 4, в котором в среднем 6 остатков лизина представляют собой N^6, замещенный [(2,7-бис-{[метилполи(оксиэтилен)]карбамоил}-9Н-флуорен-9-ил)метокси]карбонилом), который доступен от компании Nektar Therapeutics, Южный Сан-Франциско, штат Калифорния, США, или которые могут быть получены способами, известными в данной области техники, такими как способы, описанные в примере 19 публикации международной заявки на патент № WO 2018/132496 A1, или способом, описанным в примере 1 публикации заявки на патент США № US 2019/0275133 A1, описание ко-

торых включено в настоящий документ посредством ссылки. Бемпегальдеслейкин (NKTR-214) и другие пегилированные молекулы IL-2, подходящие для применения в настоящем изобретении, описаны в публикации заявки на патент США № US 2014/0328791 A1 и публикации международной заявки на патент № WO 2012/065086 A1, описание которых включено в настоящий документ посредством ссылки. Альтернативные формы конъюгированного IL-2, подходящие для применения в настоящем изобретении, описаны в патентах США №№ 4766106, 5206344, 5089261 и 4902502, описание которых включено в настоящий документ посредством ссылки. Составы IL-2, подходящие для применения в настоящем изобретении, описаны в патенте США № 6706289, описание которого включено в настоящий документ посредством ссылки.

В некоторых вариантах осуществления форма IL-2, подходящая для применения в настоящем изобретении, представляет собой THOR-707, доступный от компании Synthorx, Inc. Получение и свойства THOR-707 и дополнительных альтернативных форм IL-2, подходящих для применения в настоящем изобретении, описаны в публикациях заявок на патент США №№ US 2020/0181220 A1 и US 2020/0330601 A1, описание которых включено в настоящий документ посредством ссылки. В некоторых вариантах осуществления форма IL-2, подходящая для применения в настоящем изобретении, представляет собой конъюгат интерлейкина 2 (IL-2), содержащий: выделенный и очищенный полипептид IL-2; и конъюгирующий фрагмент, который связывается с выделенным и очищенным полипептидом IL-2 в положении аминокислоты, выбранном из K35, T37, R38, T41, F42, K43, F44, Y45, E61, E62, E68, K64, P65, V69, L72 и Y107, причем нумерация аминокислотных остатков соответствует SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах осуществления положение аминокислоты выбрано из T37, R38, T41, F42, F44, Y45, E61, E62, E68, K64, P65, V69, L72 и Y107. В некоторых вариантах осуществления положение аминокислоты выбрано из T37, R38, T41, F42, F44, Y45, E61, E62, E68, P65, V69, L72 и Y107. В некоторых вариантах осуществления положение аминокислоты выбрано из T37, T41, F42, F44, Y45, P65, V69, L72 и Y107. В некоторых вариантах осуществления положение аминокислоты выбрано из R38 и K64. В некоторых вариантах осуществления положение аминокислоты выбрано из E61, E62 и E68. В некоторых вариантах осуществления положение аминокислоты находится в положении E62. В некоторых вариантах осуществления аминокислотный остаток, выбранный из K35, T37, R38, T41, F42, K43, F44, Y45, E61, E62, E68, K64, P65, V69, L72 и Y107, дополнительно мутирован в лизин, цистеин или гистидин. В некоторых вариантах осуществления аминокислотный остаток мутирован в цистеин. В некоторых вариантах осуществления аминокислотный остаток мутирован в лизин. В некоторых вариантах осуществления аминокислотный остаток, выбранный из K35, T37, R38, T41, F42, K43, F44, Y45, E61, E62, E68, K64, P65, V69, L72 и Y107, дополнительно мутирован в неприродную аминокислоту. В некоторых вариантах осуществления неприродная аминокислота содержит N6-азидоэтокси-L-лизин (AzK), N6-пропаргилэтокси-L-лизин (PraK), BCN-L-лизин, норборненлизин, TCO-лизин, метилтетразин лизин, аллилоксикарбониллизин, 2-амино-8-оксононановая кислоту, 2-амино-8-оксооктановую кислоту, п-ацетил-L-фенилаланин, п-азидометил-L-фенилаланин (pAMF), п-йодо-L-фенилаланин, м-ацетилфенилаланин, 2-амино-8-оксононановую кислоту, п-пропаргилоксифенилаланин, п-пропаргилфенилаланин, 3-метилфенилаланин, L-Dopa, фторированный фенилаланин, изопропил-L-фенилаланин, п-азидо-L-фенилаланин, п-ацил-L-фенилаланин, п-бензоил-L-фенилаланин, п-бромфенилаланин, п-амино-L-фенилаланин, изопропил-L-фенилаланин, O-аллилтирозин, O-метил-L-тирозин, O-4-аллил-L-тирозин, 4-пропил-L-тирозин, фосфонотирозин, три-O-ацетил-GlcNAcp-серин, L-фосфосерин, фосфоносерин, L-3-(2-нафтил)аланин, 2-амино-3-((2-((3-(бензилокси)-3-оксопропил)амино)этил)селанил)пропановую кислоту, 2-амино-3-(фенилселанил)пропаноик или селеноцистеин. В некоторых вариантах осуществления конъюгат IL-2 имеет пониженную аффинность к субъединице рецептора IL-2α (IL-2Rα) в сравнении с полипептидом IL-2 дикого типа. В некоторых вариантах осуществления снижение аффинности составляет около 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99% или более 99% снижения аффинности связывания с IL-2Rα в сравнении с полипептидом IL-2 дикого типа. В некоторых вариантах осуществления снижение аффинности составляет около 1-кратное, 2-кратное, 3-кратное, 4-кратное, 5-кратное, 6-кратное, 7-кратное, 8-кратное, 9-кратное, 10-кратное, 30-кратное, 50-кратное, 100-кратное, 200-кратное, 300-кратное, 500-кратное, 1000-кратное или более в сравнении с полипептидом IL-2 дикого типа. В некоторых вариантах осуществления конъюгирующий фрагмент нарушает или блокирует связывание IL-2 с IL-2Rα. В некоторых вариантах осуществления конъюгирующий фрагмент содержит водорастворимый полимер. В некоторых вариантах осуществления дополнительный конъюгирующий фрагмент содержит водорастворимый полимер. В некоторых вариантах осуществления каждый из водорастворимых полимеров независимо содержит полиэтиленгликоль (PEG), поли(пропиленгликоль) (PPG), сополимеры этиленгликоля и пропиленгликоля, поли(оксиэтилированный полиол), поли(олефиновый спирт), поли(винилпирролидон), поли(гидроксиалкилметакриламид), поли(гидроксиалкилметакрилат), поли(сахариды), поли(а-гидроксикислоту), поли(виниловый спирт), полифосфазен, полиоксазолины (POZ), поли(N-акрилоилморфолин) или их комбинации. В некоторых вариантах осуществления каждый из водорастворимых полимеров независимо содержит PEG. В некоторых вариантах осуществления PEG представляет собой линейный PEG или разветвленный PEG. В некоторых вариантах осуществления каждый из водо-

растворимых полимеров независимо содержит полисахарид. В некоторых вариантах осуществления полисахарид содержит декстран, полисиаловую кислоту (PSA), гиалуроновую кислоту (HA), амилозу, гепарин, гепарансульфат (HS), декстрин или гидроксиэтилкрахмал (HES). В некоторых вариантах осуществления каждый из водорастворимых полимеров независимо содержит гликан. В некоторых вариантах осуществления каждый из водорастворимых полимеров независимо содержит полиамид. В некоторых вариантах осуществления конъюгирующий фрагмент содержит белок. В некоторых вариантах осуществления дополнительный конъюгирующий фрагмент содержит белок. В некоторых вариантах осуществления каждый из белков независимо содержит альбумин, трансферрин или транстиретин. В некоторых вариантах осуществления каждый из белков независимо содержит Fc-часть. В некоторых вариантах осуществления каждый из белков независимо содержит Fc-часть IgG. В некоторых вариантах осуществления конъюгирующий фрагмент содержит полипептид. В некоторых вариантах осуществления дополнительный конъюгирующий фрагмент содержит полипептид. В некоторых вариантах осуществления каждый из полипептидов независимо содержит пептид XTEN, богатый глицином полимер гомоаминокислоты (HAP), полипептид PAS, эластиноподобный полипептид (ELP), пептид CTP или желатиноподобный белок (GLK) полимер. В некоторых вариантах осуществления выделенный и очищенный полипептид IL-2 модифицирован глутамилированием. В некоторых вариантах осуществления конъюгирующий фрагмент непосредственно связан с выделенным и очищенным полипептидом IL-2. В некоторых вариантах осуществления конъюгирующий фрагмент непрямым образом связан с выделенным и очищенным полипептидом IL-2 через линкер. В некоторых вариантах осуществления линкер содержит гомобифункциональный линкер. В некоторых вариантах осуществления гомобифункциональный линкер содержит реагент Ломана дитиобис(сукцинимидилпропионат) DSP, 3'3'-дитиобис(сульфосукцинимидилпропионат) (DTSSP), дисукцинимидилсуберат (DSS), бис(сульфосукцинимидил)суберат (BS), дисукцинимидилтартрат (DST), дисульфосукцинимидилтартрат (сульфо-DST), этиленгликобис(сукцинимидилсукцинат) (EGS), дисукцинимидилглутарат (DSG), N,N'-дисукцинимидилкарбонат (DSC), диметиладипимидат (DMA), диметилпимелимидат (DMP), диметилсуберимидат (DMS), диметил-3,3'-дитиобиспропионимидат (DTBP), 1,4-ди-(3'-(2'-пиридилдитио)пропионамидо)бутан (DPDPB), бисмалеимидогексан (BMH), арилгалогенидсодержащее соединение (DFDNB), например, 1,5-дифтор-2,4-динитробензол или 1,3-дифтор-4,6-динитробензол, 4,4'-дифтор-3,3'-динитрофенилсульфон (DFDNPS), бис-[β-(4-азидосалициламидо)этил]дисульфид (BASED), формальдегид, глутаровый альдегид, диглицидиловый эфир 1,4-бутандиола, дигидразид адипиновой кислоты, карбогидразид, о-толуидин, 3,3'-диметилбензидин, бензидин, α,α'-п-диаминодифенил, дийодо-п-ксилолсульфокислоту, N,N'-этилен-бис(иодацетамид) или N,N'-гексаметилен-бис(йодацетамид). В некоторых вариантах осуществления линкер содержит гетеробифункциональный линкер. В некоторых вариантах осуществления гетеробифункциональный линкер содержит N-сукцинимидил-3-(2-пиридилдитио)пропионат (sPDP), длинноцепочечный N-сукцинимидил-3-(2-пиридилдитио)пропионат (LC-sPDP), водорастворимый длинноцепочечный N-сукцинимидил-3-(2-пиридилдитио)пропионат (сульфо-LC-sPDP), сукцинимидилоксикарбонил-α-метил-α-(2-пиридилдитио)толуол (sMPT), сульфосукцинимидил-6-[α-метил-α-(2-пиридилдитио)толуамидо]гексаноат (сульфо-LC-sMPT), сукцинимидил-4-(N-малеимидометил)циклогексан-1-карбоксилат (sMCC), сульфосукцинимидил-4-(N-малеимидометил)циклогексан-1-карбоксилат (сульфо-sMCC), сложный эфир м-малеимидобензоил-N-гидроксисукцинимида (MB), сложный эфир м-малеимидобензоил-N-гидроксисульфосукцинимида (сульфо-MB), N-сукцинимидил(4-иодоактеил)аминобензоат (sIAB), сульфосукцинимидил(4-йодоактеил)аминобензоат (сульфо-sIAB), сукцинимидил-4-(п-малеимидофенил)бутират (sMPB), сульфосукцинимидил-4-(п-малеимидофенил)бутират (сульфо-sMPB), N-(γ-малеимидобутирилокси)сукцинимидный эфир (GMB), N-(γ-малеимидобутирилокси) сульфосукцинимии деэфир (сульфо-GMB), сукцинимидил 6-((йодоацетил)амино)гексаноат (sIAX), сукцинимидил 6-[6-(((йодоацетил)амино)гексаноил)амино]гексаноат (slAXX), сукцинимидил 4-(((иодацетил)амино)метил)циклогексан-1-карбоксилат (sIAC), сукцинимидил 6-(((((4-иодацетил)амино)метил)циклогексан-1-карбонил)амино)гексаноат (sIACX), п-нитрофенилйодацетат (NPIA), карбонилреакционноспособные и сульфгидрилреакционноспособные сшивающие агенты, такие как гидразид 4-(4-N-малеимидофенил)масляной кислоты (MPBH), 4-(N-малеимидометил)циклогексан-1-карбоксигидразид-8 (M2C2H), 3-(2-пиридилдитио)пропионилгидразид (PDPH), N-гидроксисукцинимидил-4-азидосалициловая кислота (NHs-AsA), N-гидроксисульфосукцинимидил-4-азидосалициловая кислота (сульфо-NHs-AsA), сульфосукцинимидил-(4-азидосалициламидо) гексаноат (сульфо-NHs-LC-AsA), сульфосукцинимидил-2-(п-азидосалициламидо)этил-1,3'-дитиопропионат (sAsD), N-гидроксисукцинимидил-4-азидобензоат (HsAB), N-гидроксисульфосукцинимидил-4-азидобензоат (сульфо-HsAB), N-сукцинимидил-6-(4'-азидо-2'-нитрофениламино) гексаноат (sANPAH), сульфосукцинимидил-6-(4'-азидо-2'-нитрофениламино)гексаноат (сульфо-sANPAH), N-5-азидо-2-нитробензоилоксисукцинимид (ANB-NOs), сульфосукцинимидил-2-(м-азидо -о-нитробензамидо)-этил-1,3'-дитиопропионат (sAND), N-сукцинимидил-4(4-азидофенил)1,3'-дитиопропионат (sADP), N-сульфосукцинимидил(4-азидофенил)-1,3'-дитиопропионат (сульфо-sADP), сульфосукцинимидил 4-(ρ-азидофенил)бутират (сульфо-sAPB), сульфосукцинимидил 2-(7-азидо-4-метилкумарин-3-ацетамид)этил-1,3'-дитиопропионат (sAED), сульфосукци-

нимидил 7-азидо-4-метилкумин-3-ацетат (сульфо-sAMCA), п-нитрофенилдиазопируват (pNPDP), п-нитрофенил-2-диазо-3,3,3-трифторпропионат (PNP-DTP), 1-(ρ-азидосалициламидо)-4-(йодоацетамидо)бутан (AsIB), N-[4-(ρ-азидосалициламидо)бутил]-3'-(2'-пиридилдитио)пропионамид (APDP), бензофенон-4-йодацетамид, п-азидобензоилгидразид (ABH), 4-(ρ-азидосалициламидо)бутиламин (AsBA) или п-азидофенилглиоксаль (APG). В некоторых вариантах осуществления линкер содержит расщепляемый линкер, необязательно содержащий дипептидный линкер. В некоторых вариантах осуществления дипептидный линкер содержит Val-Cit, Phe-Lys, Val-Ala или Val-Lys. В некоторых вариантах осуществления линкер содержит нерасщепляемый линкер. В некоторых вариантах осуществления линкер содержит малеимидную группу, необязательно включающую малеимидокапроил (mc), сукцинимидил-4-(N-малеимидометил)циклогексан-1-карбоксилат (sMCC) или сульфосукцинимидил-4-(N-малеимидометил)циклогексан-1-карбоксилат (сульфо-sMCC). В некоторых вариантах осуществления линкер дополнительно содержит спейсер. В некоторых вариантах осуществления спейсер содержит п-аминобензиловый спирт (PAB), п-аминобензилоксикарбонил (PABC), его производное или аналог. В некоторых вариантах осуществления конъюгирующий фрагмент способен удлинять период полужизни конъюгата IL-2 в сыворотке. В некоторых вариантах осуществления дополнительный конъюгирующий фрагмент способен удлинять период полувыведения конъюгата IL-2 в сыворотке. В некоторых вариантах осуществления форма IL-2, подходящая для применения в настоящем изобретении, представляет собой фрагмент любой из описанных в настоящем документе форм IL-2. В некоторых вариантах осуществления форма IL-2, подходящая для применения в настоящем изобретении, пегилирована, как описано в публикации заявки на патент США № US 2020/0181220 A1 и публикации заявки на патент США № US 2020/0330601 A1. В некоторых вариантах осуществления форма IL-2, подходящая для применения в настоящем изобретении, представляет собой конъюгат IL-2, содержащий: полипептид IL-2, содержащий N6-азидоэтокси-L-лизин (AzK), ковалентно присоединенный к конъюгирующему фрагменту, содержащему полиэтиленгликоль (PEG), причем: полипептид IL-2 содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 5; и AzK заменяет аминокислоту в положениях K35, F42, F44, K43, E62, P65, R38, T41, E68, Y45, V69 или L72 в отношении положений аминокислот в SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах осуществления полипептид IL-2 содержит N-концевую делецию одного остатка относительно SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах осуществления форма IL-2, подходящая для применения в настоящем изобретении, не имеет взаимодействия с альфа-цепью IL-2R, но сохраняет нормальное связывание с бета-гамма-сигнальным комплексом IL-2R с промежуточной аффинностью. В некоторых вариантах осуществления форма IL-2, подходящая для применения в настоящем изобретении, представляет собой конъюгат IL-2, содержащий: полипептид IL-2, содержащий N6-азидоэтокси-L-лизин (AzK), ковалентно присоединенный к конъюгирующему фрагменту, содержащему полиэтиленгликоль (PEG), причем: полипептид IL-2 содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 5; и AzK заменяет аминокислоту в положениях K35, F42, F44, K43, E62, P65, R38, T41, E68, Y45, V69 или L72 в отношении положений аминокислот в SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах осуществления форма IL-2, подходящая для применения в настоящем изобретении, представляет собой конъюгат IL-2, содержащий: полипептид IL-2, содержащий N6-азидоэтокси-L-лизин (AzK), ковалентно присоединенный к конъюгирующему фрагменту, содержащему полиэтиленгликоль (PEG), причем: полипептид IL-2 содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 95% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 5; и AzK заменяет аминокислоту в положениях K35, F42, F44, K43, E62, P65, R38, T41, E68, Y45, V69 или L72 в отношении положений аминокислот в SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах осуществления форма IL-2, подходящая для применения в настоящем изобретении, представляет собой конъюгат IL-2, содержащий: полипептид IL-2, содержащий N6-азидоэтокси-L-лизин (AzK), ковалентно присоединенный к конъюгирующему фрагменту, содержащему полиэтиленгликоль (PEG), причем: полипептид IL-2 содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 98% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 5; и AzK заменяет аминокислоту в положениях K35, F42, F44, K43, E62, P65, R38, T41, E68, Y45, V69 или L72 в отношении положений аминокислот b SEQ ID NO: 5.

В некоторых вариантах осуществления форма IL-2, подходящая для применения в настоящем изобретении, представляет собой немвалейкин альфа, также известный как ALKS-4230 (SEQ ID NO: 6), который доступен от компании Alkermes, Inc. Немвалейкин альфа также известен как фрагмент человеческого интерлейкина 2 (1-59), вариант (Cys^{125}>Ser^{51}), слитый через пептидильный линкер ($^{60}GG^{61}$) с фрагментом человеческого интерлейкина 2 (62-132), слитый через пептидильный линкер ($^{133}GSGGGS^{138}$) с человеческим фрагментом α-цепи рецептора интерлейкина 2 (139-303), продуцируемый клетками яичника китайского хомяка (CHO), гликозилированный; человеческий интерлейкин 2 (IL-2) (75-133)-пептид [Cys^{125}(51)>Ser]-мутант (1-59), слитый через пептидный линкер G2 (60-61) с интерлейкином 2 человека (IL-2) (4-74)-пептид (62-132) и через пептидный линкер GSG_3S (133-138) с α-цепью человеческого рецептора интерлейкина 2 (альфа-субъединица IL2R, IL2Rα, IL2RA) (1-165)-пептид (139 -303), продуцируемый в клетках яичника китайского хомяка (CHO), гликоформ альфа. Аминокислотная последовательность немвалейкина альфа приведена в SEQ ID NO: 6. В некоторых вариантах осуществления немвалей-

кин альфа проявляет следующие посттрансляционные модификации: дисульфидные мостики в положениях: 31-116, 141-285, 184-242, 269-301, 166-197 или 166-199, 168-199 или 168-197 (с применением нумерации в SEQ ID NO: 6), и сайты гликозилирования в положениях: N187, N206, T212 с применением нумерации в SEQ ID NO: 6. Получение и свойства немвалейкина альфа, а также дополнительных альтернативных форм IL-2, подходящих для применения в настоящем изобретении, описаны в публикации заявки на патент США № US 2021/0038684 A1 и патенте США № 10183979, описание которых включено в настоящий документ посредством ссылки. В некоторых вариантах осуществления форма IL-2, подходящая для применения в настоящем изобретении, представляет собой белок, имеющий по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 90% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 6. В некоторых вариантах осуществления форма IL-2, подходящая для применения в настоящем изобретении, имеет аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 6, или ее консервативные аминокислотные замены. В некоторых вариантах осуществления форма IL-2, подходящая для применения в настоящем изобретении, представляет собой слитый белок, содержащий аминокислоты 24-452 в SEQ ID NO: 7 или их варианты, фрагменты или производные. В некоторых вариантах осуществления форма IL-2, подходящая для применения в настоящем изобретении, представляет собой слитый белок, содержащий аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 90% идентичность аминокислотной последовательности. 24-452 в SEQ ID NO: 7 или их варианты, фрагменты или производные. Другие формы IL-2, подходящие для применения в настоящем изобретении, описаны в патенте США № 10183979, описание которого включено в настоящий документ посредством ссылки. Необязательно, в некоторых вариантах осуществления форма IL-2, подходящая для применения в настоящем изобретении, представляет собой слитый белок, содержащий первый партнер слияния, который связан со вторым партнером слияния полипептидным линкером с доменом муцина, причем первый партнер слияния представляет собой IL-IRα или белок, имеющий по меньшей мере 98% идентичность аминокислотной последовательности с IL-IRα и обладающий активностью антагониста рецептора IL-Rα, и причем второй партнер слияния содержит весь или часть иммуноглобулина, содержащего Fc-участок, причем полипептидный линкер с доменом муцина содержит SEQ ID NO: 8 или аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 8, и причем период полужизни слитого белка улучшен в сравнении со слиянием первого партнера слияния со вторым партнером слияния в отсутствие полипептидного линкера с доменом муцина.

Таблица 2

Аминокислотные последовательности интерлейкинов

Идентификатор	**Последовательность (однобуквенные символы аминокислот)**
SEQ ID NO:3 рекомбинантный человеческий IL-2 (rhIL-2)	MAPTSSSTKK TQLQLEHLLL DLQMILNGIN NYKNPKLTRM LTFKFYMPKK ATELKHLQCL 60 EEELKPLEEV LNLAQSKNFH LRPRDLISNI NVIVLELKGS ETTFMCEYAD ETATIVEFLN 120 RWITFCQSII STLT 134
SEQ ID NO:4 Альдеслейкин	PTSSSTKKTQ LQLEHLLLDL QMILNGINNY KNPKLTRMLT FKFYMPKKAT ELKHLQCLEE 60 ELKPLEEVLN LAQSKNFHLR PRDLISNINV IVLELKGSET TFMCEYADET ATIVEFLNRW 120 ITFSQSIIST LT 132
SEQ ID NO:5 форма IL-2	APTSSSTKKT QLQLEHLLLD LQMILNGINN YKNPKLTRML TFKFYMPKKA TELKHLQCLE 60 EELKPLEEVL NLAQSKNFHL RPRDLISNIN VIVLELKGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNR 120 WITFCQSIIS TLT 133
SEQ ID NO:6 Немвалейкин альфа	SKNFHLRPRD LISNINVIVL ELKGSETTFM CEYADETATI VEFLNRWITF SQSIISTLTG 60 GSSSTKKTQL QLEHLLLDLQ MILNGINNYK NPKLTRMLTF KFYMPKKATE LKHLQCLEEE 120 LKPLEEVLNL AQGSGGGSEL CDDDPPEIPH ATFKAMAYKE GTMLNCECKR GFRRIKSGSL 180 YMLCTGNSSH SSWDNQCQCT SSATRNTTKQ VTPQPEEQKE RKTTEMQSPM QPVDQASLPG 240 HCREPPPWEN EATERIYHFV VGQMVYYQCV QGYRALHRGP AESVCKMTHG KTRWTQPQLI 300 CTG 303
SEQ ID NO:7 форма IL-2	MDAMKRGLCC VLLLCGAVFV SARRPSGRKS SKMQAFRIWD VNQKTFYLRN NQLVAGYLQG 60 PNVNLEEKID VVPIEPHALF LGIHGGKMCL SCVKSGDETR LQLEAVNITD LSENRKQDKR 120

	FAFIRSDSGP TTSFESAACP GWFLCTAMEA DQPVSLTNMP DEGVMVTKFY FQEDESGSGG 180 ASSESSASSD GPHPVITESR ASSESSASSD GPHPVITESR EPKSSDKTHT CPPCPAPELL 240 GGPSVFLFPP KPKDTLMISR TPEVTCVVVD VSHEDPEVKF NWYVDGVEVH NAKTKPREEQ 300 YNSTYRVVSV LTVLHQDWLN GKEYKCKVSN KALPAPIEKT ISKAKGQPRE PQVYTLPPSR 360 EEMTKNQVSL TCLVKGFYPS DIAVEWESNG QPENNYKTTP PVLDSDGSFF LYSKLTVDKS 420 RWQQGNVFSC SVMHEALHNH YTQKSLSLSP GK 452
SEQ ID NO:8 полипептид с доменом муцина	SESSASSDGP HPVITP 16
SEQ ID NO:9 рекомбинантный человеческий IL-4 (rhIL-4)	MHKCDITLQE IIKTLNSLTE QKTLCTELTV TDIFAASKNT TEKETFCRAA TVLRQFYSHH 60 EKDTRCLGAT AQQFHRHKQL IRFLKRLDRN LWGLAGLNSC PVKEANQSTL ENFLERLKTI 120 MREKYSKCSS 130
SEQ ID NO:10 рекомбинантный человеческий IL-7 (rhIL-7)	MDCDIEGKDG KQYESVLMVS IDQLLDSMKE IGSNCLNNEF NFFKRHICDA NKEGMFLFRA 60 ARKLRQFLKM NSTGDFDLHL LKVSEGTTIL LNCTGQVKGR KPAALGEAQP TKSLEENKSL 120 KEQKKLNDLC FLKRLLQEIK TCWNKILMGT KEH 153
SEQ ID NO:11 рекомбинантный человеческий IL-15 (rhIL-15)	MNWVNVISDL KKIEDLIQSM HIDATLYTES DVHPSCKVTA MKCFLLELQV ISLESGDASI 60 HDTVENLIIL ANNSLSSNGN VTESGCKECE ELEEKNIKEF LQSFVHIVQM FINTS 115
SEQ ID NO:12 рекомбинантный человеческий IL-21 (rhIL-21)	MQDRHMIRMR QLIDIVDQLK NYVNDLVPEF LPAPEDVETN CEWSAFSCFQ KAQLKSANTG 60 NNERIINVSI KKLKRKPPST NAGRRQKHRL TCPSCDSYEK KPPKEFLERF KSLLQKMIHQ 120 HLSSRTHGSE DS 132

В некоторых вариантах осуществления форма IL-2, подходящая для применения в настоящем изобретении, включает белок с привитым антителом-цитокином, содержащий вариабельную область тяжелой цепи (), включающую определяющие комплементарность области HCDR1, HCDR2, HCDR3; вариабельную область легкой цепи (V_L), включающую LCDR1, LCDR2, LCDR3; и молекулу IL-2 или ее фрагмент, привитый в CDR V_H или V_L, причем белок с привитым антителом-цитокином предпочтительно размножает эффекторные Т-клетки в сравнении с регуляторными Т-клетками. В одном варианте осуществления белок с привитым антителом-цитокином содержит вариабельную область тяжелой цепи (V_H), включающую определяющие комплементарность области HCDR1, HCDR2, HCDR3; вариабельную область легкой цепи (V_L), включающую LCDR1, LCDR2, LCDR3; и молекулу IL-2 или ее фрагмент, привитый в CDR V_H или V_L, причем молекула IL-2 представляет собой мутеин, и причем белок с привитым антителом-цитокином предпочтительно размножает эффекторные Т-клетки в сравнении с регуляторны-

ми Т-клетками. В одном варианте осуществления схема IL-2 включает введение антитела, описанного в публикации заявки на патент США № US 2020/0270334 A1, описание которой включено в настоящий документ посредством ссылки. В одном варианте осуществления белок с привитым антителом-цитокином содержит вариабельную область тяжелой цепи (V_H), включающую определяющие комплементарность области HCDR1, HCDR2, HCDR3; вариабельную область легкой цепи (V_L), включающую LCDR1, LCDR2, LCDR3; и молекулу IL-2 или ее фрагмент, привитый в CDR V_H или V_L, причем молекула IL-2 представляет собой мутеин, причем белок с привитым антителом-цитокином предпочтительно размножает эффекторные Т-клетки в сравнении с регуляторными Т-клетками, и причем антитело дополнительно содержит тяжелую цепь класса IgG и легкую цепь класса IgG, выбранную из группы, состоящей из: легкой цепи класса IgG, содержащей SEQ ID NO: 39, и тяжелой цепи класса IgG, содержащей SEQ ID NO: 38; легкой цепи класса IgG, содержащей SEQ ID NO: 37, и тяжелой цепи класса IgG, содержащей SEQ ID NO: 29; легкой цепи класса IgG, содержащей SEQ ID NO: 39, и тяжелой цепи класса IgG, содержащей SEQ ID NO: 29; и легкой цепи класса IgG, содержащей SEQ ID NO: 37, и тяжелой цепи класса IgG, содержащей SEQ ID NO: 38.

В одном варианте осуществления молекула IL-2 или ее фрагмент привиты в HCDR1 V_H, причем молекула IL-2 представляет собой мутеин. В одном варианте осуществления молекула IL-2 или ее фрагмент привиты в HCDR2 V_H, причем молекула IL-2 представляет собой мутеин. В одном варианте осуществления молекула IL-2 или ее фрагмент привиты в HCDR3 V_H, причем молекула IL-2 представляет собой мутеин. В одном варианте осуществления молекула IL-2 или ее фрагмент привиты в LCDR1 V_L, причем молекула IL-2 представляет собой мутеин. В одном варианте осуществления молекула IL-2 или ее фрагмент привиты в LCDR2 V_L, причем молекула IL-2 представляет собой мутеин. В одном варианте осуществления молекула IL-2 или ее фрагмент привиты в LCDR3 V_L, причем молекула IL-2 представляет собой мутеин.

Вставка молекулы IL-2 может быть в N-концевой области CDR или рядом с ней, в средней области CDR или в С-концевой области CDR или рядом с ней. В некоторых вариантах осуществления белок с привитым антителом-цитокином содержит молекулу IL-2, встроенную в CDR, причем последовательность IL2 не сдвигает рамку считывания последовательности CDR. В некоторых вариантах осуществления белок с привитым антителом-цитокином содержит молекулу IL-2, встроенную в CDR, причем последовательность IL-2 полностью или частично заменяет последовательность CDR. Замена молекулой IL-2 может быть в N-концевой области CDR, в средней области CDR или в С-концевой области CDR или рядом с ней. Замена молекулой IL-2 может состоять всего из одной или двух аминокислот в последовательности CDR или всей последовательности CDR.

В некоторых вариантах осуществления молекула IL-2 прививается непосредственно в CDR без пептидного линкера, без дополнительных аминокислот между последовательностью CDR и последовательностью IL-2. В некоторых вариантах осуществления молекула IL-2 непрямым образом припивается в CDR с помощью пептидного линкера с одной или более дополнительными аминокислотами между последовательностью CDR и последовательностью IL-2.

В некоторых вариантах осуществления молекула IL-2, описанная в настоящем документе, представляет собой мутеин IL-2. В некоторых случаях мутеин IL-2 содержит замену R67A. В некоторых вариантах осуществления мутеин IL-2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14 или SEQ ID NO: 15. В некоторых вариантах осуществления мутеин IL-2 содержит аминокислотную последовательность, приведенную в табл. 1 в публикации заявки на патент США № US 2020/0270334 A1, описание которой включено в настоящий документ посредством ссылки.

В одном варианте осуществления белок с привитым антителом-цитокином содержит HCDR1, выбранный из группы, состоящей из SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 22 и SEQ ID NO: 25. В одном варианте осуществления белок с привитым антителом-цитокином содержит HCDR1, выбранный из группы, состоящей из SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 13 и SEQ ID NO: 16. В одном варианте осуществления белок с привитым антителом-цитокином содержит HCDR1, выбранный из группы, состоящей из HCDR2, выбранного из группы, состоящей из SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 23 и SEQ ID NO: 26. В одном варианте осуществления белок с привитым антителом-цитокином содержит HCDR3, выбранный из группы, состоящей из SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 24 и SEQ ID NO: 27. В одном варианте осуществления белок с привитым антителом-цитокином содержит область V_H, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 28. В одном варианте осуществления белок с привитым антителом-цитокином содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 29. В одном варианте осуществления белок с привитым антителом-цитокином содержит область V_L, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 36. В одном варианте осуществления белок с привитым антителом-цитокином содержит легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 37. В одном варианте осуществления белок с привитым антителом-цитокином содержит область V_H, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 28, и область V_L, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 36. В одном варианте осуществления белок с привитым антителом-цитокином содержит участок тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 29, и участок легкой цепи, содержа-

щий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 37. В одном варианте осуществления белок с привитым антителом-цитокином содержит участок тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 29, и участок легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 39. В одном варианте осуществления белок с привитым цитокином антитела содержит участок тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 38, и участок легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 37. В одном варианте осуществления белок с привитым антителом-цитокином содержит участок тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 38, и участок легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 39. В одном варианте осуществления белок с привитым антителом-цитокином содержит IgG.IL2F71A.H1 или IgG.IL2R67A.H1 из публикации заявки на патент США № 2020/0270334 A1, или их варианты, производные или фрагменты, или их консервативные аминокислотные замены, или белки с по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 98% идентичностью последовательности. В одном варианте осуществления компоненты антител белка с привитым антителом-цитокином, описанные в настоящем документе, включают последовательности иммуноглобулинов, каркасные последовательности или последовательности CDR паливизумаба. В некоторых вариантах осуществления белок с привитым антителом-цитокином, описанный в настоящем документе, имеет более длительный период полужизни в сыворотке, чем молекула IL-2 дикого типа, такая как, помимо прочего, альдеслейкин или сравнимая молекула. В одном варианте осуществления белок с привитым антителом-цитокином, описанный в настоящем документе, имеет последовательность, указанную в табл. 3.

Таблица 3

Последовательности иллюстративных белков с привитым антителом паливизумаб-IL-2

Идентификатор	**Последовательность (однобуквенные символы аминокислот)**
SEQ ID NO:13 IL-2	MYRMQLLSCI ALSLALVTNS APTSSSTKKT QLQLEHLLLD LQMILNGINN YKNPKLTRML 60 TFKFYMPKKA TELKHLQCLE EELKPLEEVL NLAQSKNFHL RPRDLISNIN VIVLELKGSE 120 TTFMCEYADE TATIVEFLNR WITFCQSIIS TLT 153
SEQ ID NO:14 мутеин IL-2	APTSSSTKKT QLQLEHLLLD LQMILNGINN YKNPKLTAML TFKFYMPKKA TELKHLQCLE 60 EELKPLEEVL NLAQSKNFHL RPRDLISNIN VIVLELKGSE

	TTFMCEYADE TATIVEFLNR 120 WITFCQSIIS TLT 133
SEQ ID NO:15 мутеин IL-2	APTSSSTKKT QLQLEHLLLD LQMILNGINN YKNPKLTRML TAKFYMPKKA TELKHLQCLE 60 EELKPLEEVL NLAQSKNFHL RPRDLISNIN VIVLELKGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNR 120 WITFCQSIIS TLT 133
SEQ ID NO:16 HCDR1_IL-2	GFSLAPTSSS TKKTQLQLEH LLLDLQMILN GINNYKNPKL TAMLTFKFYM PKKATELKHL 60 QCLEEELKPL EEVLNLAQSK NFHLRPRDLI SNINVIVLEL KGSETTFMCE YADETATIVE 120 FLNRWITFCQ SIISTLTSTS GMSVG 145
SEQ ID NO:17 HCDR2	DIWWDDKKDY NPSLKS 16
SEQ ID NO:18 HCDR3	SMITNWYFDV 10
SEQ ID NO:19 HCDR1_IL-2 по Kabat	APTSSSTKKT QLQLEHLLLD LQMILNGINN YKNPKLTAML TFKFYMPKKA TELKHLQCLE 60 EELKPLEEVL NLAQSKNFHL RPRDLISNIN VIVLELKGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNR 120 WITFCQSIIS TLTSTSGMSV G 141
SEQ ID NO:20 HCDR2 по Kabat	DIWWDDKKDY NPSLKS 16
SEQ ID NO:21 HCDR3 по Kabat	SMITNWYFDV 10
SEQ ID NO:22 HCDR1_IL-2 по Clothia	GFSLAPTSSS TKKTQLQLEH LLLDLQMILN GINNYKNPKL TAMLTFKFYM PKKATELKHL 60 QCLEEELKPL EEVLNLAQSK NFHLRPRDLI SNINVIVLEL KGSETTFMCE YADETATIVE 120 FLNRWITFCQ SIISTLTSTS GM 142
SEQ ID NO:23 HCDR2 по	WWDDK 5

Clothia	
SEQ ID NO:24 HCDR3 по Clothia	SMITNWYFDV 10
SEQ ID NO:25 HCDR1_IL-2 IMGT	GFSLAPTSSS TKKTQLQLEH LLLDLQMILN GINNYKNPKL TAMLTFKFYM PKKATELKHL 60 QCLEEELKPL EEVLNLAQSK NFHLRPRDLI SNINVIVLEL KGSETTFMCE YADETATIVE 120 FLNRWITFCQ SIISTLTSTS GMS 143
SEQ ID NO:26 HCDR2 IMGT	IWWDDKK 7
SEQ ID NO:27 HCDR3 IMGT	ARSMITNWYF DV 12
SEQ ID NO:28 V_H	QVTLRESGPA LVKPTQTLTL TCTFSGFSLA PTSSSTKKTQ LQLEHLLLDL QMILNGINNY 60 KNPKLTAMLT FKFYMPKKAT ELKHLQCLEE ELKPLEEVLN LAQSKNFHLR PRDLISNINV 120 IVLELKGSET TFMCEYADET ATIVEFLNRW ITFCQSIIST LTSTSGMSVG WIRQPPGKAL 180 EWLADIWWDD KKDYNPSLKS RLTISKDTSK NQVVLKVTNM DPADTATYYC ARSMITNWYF 240 DVWGAGTTVT VSS 253
SEQ ID NO:29 Тяжелая цепь	QMILNGINNY KNPKLTAMLT FKFYMPKKAT ELKHLQCLEE ELKPLEEVLN LAQSKNFHLR 60 PRDLISNINV IVLELKGSET TFMCEYADET ATIVEFLNRW ITFCQSIIST LTSTSGMSVG 120 WIRQPPGKAL EWLADIWWDD KKDYNPSLKS RLTISKDTSK NQVVLKVTNM DPADTATYYC 180 ARSMITNWYF DVWGAGTTVT VSSASTKGPS VFPLAPSSKS TSGGTAALGC LVKDYFPEPV 240 TVSWNSGALT SGVHTFPAVL QSSGLYSLSS VVTVPSSSLG TQTYICNVNH KPSNTKVDKR 300 VEPKSCDKTH TCPPCPAPEL LGGPSVFLFP PKPKDTLMIS RTPEVTCVVV AVSHEDPEVK 360 FNWYVDGVEV HNAKTKPREE QYNSTYRVVS VLTVLHQDWL

	NGKEYKCKVS NKALAAPIEK 420 TISKAKGQPR EPQVYTLPPS REEMTKNQVS LTCLVKGFYP SDIAVEWESN GQPENNYKTT 480 PPVLDSDGSF FLYSKLTVDK SRWQQGNVFS CSVMHEALHN HYTQKSLSLS PGK 533
SEQ ID NO:30 LCDR1 по Kabat	KAQLSVGYMH 10
SEQ ID NO:31 LCDR2 по Kabat	DTSKLAS 7
SEQ ID NO:32 LCDR3 по Kabat	FQGSGYPFT 9
SEQ ID NO:33 LCDR1 по Chothia	QLSVGY 6
SEQ ID NO:34 LCDR2 по Chothia	DTS 3
SEQ ID NO:35 LCDR3 по Chothia	GSGYPF 6
SEQ ID NO:36 V_L	DIQMTQSPST LSASVGDRVT ITCKAQLSVG YMHWYQQKPG KAPKLLIYDT SKLASGVPSR 60 FSGSGSGTEF TLTISSLQPD DFATYYCFQG SGYPFTFGGG TKLEIK 106
SEQ ID NO:37 Легкая цепь	DIQMTQSPST LSASVGDRVT ITCKAQLSVG YMHWYQQKPG KAPKLLIYDT SKLASGVPSR 60 FSGSGSGTEF TLTISSLQPD DFATYYCFQG SGYPFTFGGG TKLEIKRTVA APSVFIFPPS 120 DEQLKSGTAS VVCLLNNFYP REAKVQWKVD NALQSGNSQE SVTEQDSKDS TYSLSSTLTL 180 SKADYEKHKV YACEVTHQGL SSPVTKSFNR GEC 213

SEQ ID NO:38 Легкая цепь	QVTLRESGPA LVKPTQTLTL TCTFSGFSLA PTSSSTKKTQ LQLEHLLLDL QMILNGINNY 60 KNPKLTRMLT AKFYMPKKAT ELKHLQCLEE ELKPLEEVLN LAQSKNFHLR PRDLISNINV 120 IVLELKGSET TFMCEYADET ATIVEFLNRW ITFCQSIIST LTSTSGMSVG WIRQPPGKAL 180 EWLADIWWDD KKDYNPSLKS RLTISKDTSK NQVVLKVTNM DPADTATYYC ARSMITNWYF 240 DVWGAGTTVT VSSASTKGPS VFPLAPSSKS TSGGTAALGC LVKDYFPEPV TVSWNSGALT 300 SGVHTFPAVL QSSGLYSLSS VVTVPSSSLG TQTYICNVNH KPSNTKVDKR VEPKSCDKTH 360 TCPPCPAPEL LGGPSVFLFP PKPKDTLMIS RTPEVTCVVV AVSHEDPEVK FNWYVDGVEV 420 HNAKTKPREE QYNSTYRVVS VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS NKALAAPIEK TISKAKGQPR 480 EPQVYTLPPS REEMTKNQVS LTCLVKGFYP SDIAVEWESN GQPENNYKTT PPVLDSDGSF 540 FLYSKLTVDK SRWQQGNVFS CSVMHEALHN HYTQKSLSLS PGK 583
SEQ ID NO:39 Легкая цепь	DIQMTQSPST LSASVGDRVT ITCKAQLSVG YMHWYQQKPG KAPKLLIYDT SKLASGVPSR 60 FSGSGSGTEF TLTISSLQPD DFATYYCFQG SGYPFTFGGG TKLEIKRTVA APSVFIFPPS 120 DEQLKSGTAS VVCLLNNFYP REAKVQWKVD NALQSGNSQE SVTEQDSKDS TYSLSSTLTL 180 SKADYEKHKV YACEVTHQGL SSPVTKSFNR GEC 213

Термин "IL-4" (также называемый в настоящем документе "IL4") относится к цитокину, известному как интерлейкин 4, который продуцируется Т-клетками Th2 и эозинофилами, базофилами и тучными клетками. IL-4 регулирует дифференцировку наивных Т-хелперов (клеток Th0) в Т-клетки Th2. Steinke and Borish, Respir. Res. 2001, 2, 66-70. После активации посредством IL-4 Т-клетки Th2 впоследствии продуцируют дополнительный IL-4 в петле положительной обратной связи. IL-4 также стимулирует пролиферацию В-клеток и экспрессию MHC класса II и индуцирует переключение класса на экспрессию IgE и IgG_1 из В-клеток. Рекомбинантный человеческий IL-4, подходящий для применения в настоящем изобретении, коммерчески доступен от нескольких поставщиков, включая ProSpec-Tany TechnoGene Ltd., Ист-Брансуик, штат Нью-Джерси, США (кат. № CYT-211) и ThermoFisher Scientific, Inc., Уолтем, США, штат Массачусетс, США (рекомбинантный человеческий белок IL-15, кат. № Gibco CTP0043). Аминокислотная последовательность рекомбинантного человеческого IL-4, подходящая для применения в настоящем изобретении, представлена в табл. 2 (SEQ ID NO: 9).

Термин "IL-4" (также называемый в настоящем документе "IL4") относится к цитокину, известному как интерлейкин 4, который продуцируется Т-клетками Th2 и эозинофилами, базофилами и тучными клетками. IL-4 регулирует дифференцировку наивных Т-хелперов (клеток Th0) в Т-клетки Th2. Steinke and Borish, Respir. Res. 2001, 2, 66-70. После активации посредством IL-4 Т-клетки Th2 впоследствии продуцируют дополнительный IL-4 в петле положительной обратной связи. IL-4 также стимулирует пролиферацию В-клеток и экспрессию MHC класса II и индуцирует переключение класса на экспрессию IgE и IgG_1 из В-клеток. Рекомбинантный человеческий IL-4, подходящий для применения в настоящем изобретении, коммерчески доступен от нескольких поставщиков, включая ProSpec-Tany TechnoGene Ltd.,

Ист-Брансуик, штат Нью-Джерси, США (кат. № CYT-211) и ThermoFisher Scientific, Inc., Уолтем, США, штат Массачусетс, США (рекомбинантный человеческий белок IL-15, кат. № Gibco CTP0043). Аминокислотная последовательность рекомбинантного человеческого IL-4, подходящая для применения в настоящем изобретении, представлена в табл. 2 (SEQ ID NO: 5).

Термин "IL-7" (также называемый в настоящем документе "IL7") относится к гликозилированному цитокину тканевого происхождения, 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 рецептора с общей гамма-цепью, которые в серии сигналов важны для развития Т-клеток в тимусе и выживания на периферии. Рекомбинантный человеческий IL-7, подходящий для применения в настоящем изобретении, коммерчески доступен от нескольких поставщиков, включая ProSpec-Tany TechnoGene Ltd., Ист-Брансуик, штат Нью-Джерси, США (кат. № CYT-254) и ThermoFisher Scientific, Inc., Уолтем, США, штат Массачусетс, США (рекомбинантный человеческий белок IL-15, кат. № Gibco PHC0071). Аминокислотная последовательность рекомбинантного человеческого IL-7, подходящая для применения в настоящем изобретении, представлена в табл. 2 (SEQ ID NO: 6).

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

Термин "IL-21" (также называемый в настоящем документе "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, биоаналоги и их варианты. IL-21 описан, например, в документе Spolski and Leonard, Nat. Rev. Drug. Disc. 2014,13, 379-95, описание которого включено в настоящий документ посредством ссылки. IL-21 в основном продуцируется естественными Т-киллерами и активированными Т-клетками $CD4^+$ человека. Рекомбинантный человеческий IL-21 представляет собой одиночную негликозилированную полипептидную цепь, содержащую 132 аминокислоты с молекулярной массой 15,4 кДа. Рекомбинантный человеческий IL-21 коммерчески доступен от нескольких поставщиков, включая ProSpec-Tany TechnoGene Ltd., Ист-Брансуик, штат Нью-Джерси, США (кат. № CYT-408-b) и ThermoFisher Scientific, Inc., Уолтем, США, штат Массачусетс, США (рекомбинантный человеческий белок IL-21, кат. № 14-8219-80). Аминокислотная последовательность рекомбинантного человеческого IL-21, подходящая для применения в настоящем изобретении, представлена в табл. 2 (SEQ ID NO: 8).

Когда указывается "противоопухолевое эффективное количество", "ингибирующее опухоль эффективное количество" или "терапевтическое количество", точное количество композиции по настоящему изобретению, подлежащее введению, может быть определено врачом с учетом индивидуальных различий по возрасту, массе, размеру опухоли, степени инфекции или метастазирования, а также состояния пациента (субъекта). В целом можно утверждать, что фармацевтическую композицию, содержащую инфильтрирующие опухоль лимфоциты (например, вторичные TIL или генетически модифицированные цитотоксические лимфоциты), описанные в настоящем документе, можно вводить в дозе от 10^4 до 10^{11} клеток/кг массы тела (например, от 10^5 до 10^6, от 10^5 до 10^{10}, от 10^5 до 10^{11}, от 10^6 до 10^{10}, от 10^6 до 10^{11}, от 10^7 до 10^{11}, от 10^7 до 10^{10}, от 10^8 до 10^{11}, от 10^8 до 10^{10}, от 10^9 до 10^{11} или от 10^9 до 10^{10} клеток/кг массы тела), включая все целые значения в этих диапазонах. Композиции инфильтрирующих опухоль лимфоцитов (включая в некоторых случаях генетически модифицированные цитотоксические лимфоциты) также можно вводить многократно в этих дозировках. Инфильтрирующие опухоль лимфоциты (в том числе в некоторых случаях генетически модифицированные цитотоксические лимфоциты) можно вводить с помощью методов инфузии, которые широко известны в иммунотерапии (см., например, Rosenberg et al., NewEng. J. of Med. 319: 1676, 1988). Специалист в области медицины легко может определить оптимальную дозировку и схему лечения для конкретного пациента путем наблюдения пациента в отношении признаков заболевания и соответствующей корректировки лечения.

Термин "гематологическое злокачественное новообразование" или термины соответствующего значения относятся к раковым заболеваниям млекопитающих и опухолям кроветворной и лимфоидной тканей, включая, помимо прочего, ткани крови, костного мозга, лимфатических узлов и лимфатической системы. Гематологические злокачественные новообразования также называют "жидкими опухолями". Ге-

матологические злокачественные новообразования включают, помимо прочего, острый лимфобластный лейкоз (ALL), хроническую лимфоцитарную лимфому (CLL), малую лимфоцитарную лимфому (SLL), острый миелогенный лейкоз (AML), хронический миелогенный лейкоз (CML), острый моноцитарный лейкоз (AMoL), лимфому Ходжкина и неходжкинские лимфомы. Термин "В-клеточное гематологическое злокачественное новообразование" относится к гематологическим злокачественным новообразованиям, которые поражают В-клетки.

Термин "солидная опухоль" относится к аномальной массе ткани, которая обычно не содержит кист или жидких участков. Солидные опухоли могут быть доброкачественными или злокачественными. Термин "солидная злокачественная опухоль" относится к злокачественным, неопластическим или раковым солидным опухолям. Солидные злокачественные опухоли включают, помимо прочего, саркомы, карциномы и лимфомы, такие как рак легкого, молочной железы, предстательной железы, толстой кишки, прямой кишки и мочевого пузыря. Тканевая структура солидных опухолей включает взаимозависимые тканевые компартменты, включая паренхиму (раковые клетки) и поддерживающие стромальные клетки, в которых диспергированы раковые клетки и которые могут обеспечивать поддерживающее микроокружение.

Термин "жидкая опухоль" относится к аномальной массе клеток, которая по своей природе является жидкой. Жидкие раковые опухоли включают, помимо прочего, лейкемии, миеломы и лимфомы, а также другие гематологические злокачественные новообразования. TIL, полученные из жидких опухолей, также могут называться в настоящем документе инфильтрирующими костный мозг лимфоцитами (MIL). TIL, полученные из жидких опухолей, включая жидкие опухоли, циркулирующие в периферической крови, также могут называться в настоящем документе PBL. Термины MIL, TIL и PBL применяются в настоящем документе взаимозаменяемо и различаются только в зависимости от типа ткани, из которой получены клетки.

Термин "микроокружение" в контексте настоящего документа может относиться к микроокружению солидной или гематологической опухоли в целом или к отдельной подгруппе клеток в микроокружении. Микроокружение опухоли в контексте настоящего документа относится к сложной смеси "клеток, растворимых факторов, сигнальных молекул, внеклеточных матриц и механических сигналов, которые способствуют неопластической трансформации, поддерживают рост и инвазию опухоли, защищают опухоль от иммунитета хозяина, способствуют терапевтической резистентности и обеспечивают ниши для процветания доминирующих метастазов", как описано в Swartz, et al., Cancer Res., 2012, 72, 2473. Хотя опухоли экспрессируют антигены, которые должны распознаваться Т-клетками, клиренс опухоли иммунной системой происходит редко из-за подавления иммунитета микроокружением.

Термин "динамическое планирование" в контексте настоящего документа может относиться к созданию гибкого расписания для событий, которые должны иметь место, на основе исхода или результата одного или более последующих событий. Таким образом, запланированная дата события, такого как событие лечения пациента, может быть динамически изменена на основе исхода или результата одного или более производственных этапов, выполненных после планирования запланированной даты, но до события.

В одном варианте осуществления изобретение относится к способу лечения рака с помощью популяции TIL, в котором пациента предварительно лечат немиелоаблативной химиотерапией до инфузии TIL по настоящему изобретению. В некоторых вариантах осуществления может быть предоставлена популяция TIL, в которой пациента предварительно лечат немиелоаблативной химиотерапией до инфузии TIL по настоящему изобретению. В одном варианте осуществления немиелоаблативной химиотерапией является циклофосфамид в дозе 60 мг/кг/сут в течение 2 дней (дни 27 и 26 до инфузии TIL) и флударабин в дозе 25 мг/м^2/сутки в течение 5 дней (дни с 27 по 23 до инфузии TIL). В одном варианте осуществления после немиелоаблативной химиотерапии и инфузии TIL (в день 0) по настоящему изобретению пациент получает внутривенную инфузию IL-2 внутривенно в дозе 720000 МЕ/кг каждые 8 ч до физиологической переносимости.

Экспериментальные данные показывают, что лимфодеплеция до адоптивного переноса опухолеспецифических Т-лимфоцитов играет ключевую роль в повышении эффективности лечения за счет устранения регуляторных Т-клеток и конкурирующих элементов иммунной системы ("цитокиновые осадки"). Соответственно, в некоторых вариантах осуществления изобретения до введения rTIL по настоящему изобретению в отношении пациента применяют стадию лимфодеплеции (иногда также называемую "иммуносупрессивным кондиционированием").

Термины "совместное введение", "введенный в сочетании с", "введение в сочетании с", "одновременный" и "параллельный" в контексте настоящего документа охватывают введение двух или более активных фармацевтических ингредиентов (в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, например, по меньшей мере один агонист калиевых каналов в сочетании со множеством TIL) субъекту, так что оба активных фармацевтических ингредиента и/или их метаболиты присутствуют у субъекта одновременно. Совместное введение включает одновременное введение отдельных композиций, введение в разное время отдельных композиций или введение композиции, в которой присутствуют два или более активных фармацевтических ингредиента. Предпочтительны одновременное введение от-

дельных композиций и введение композиции, в которой присутствуют оба агента.

Термин "эффективное количество" или "терапевтически эффективное количество" относится к такому количеству соединения или комбинации соединений, как описано в настоящем документе, которое достаточно для осуществления предполагаемого применения, включая, помимо прочего, лечение заболевания. Терапевтически эффективное количество может варьироваться в зависимости от предполагаемого применения (in vitro или in vivo), субъекта и болезненного состояния, подлежащего лечению (например, массы, возраста и пола субъекта), тяжести болезненного состояния или способа введения. Этот термин также применяется к дозе, которая будет вызывать конкретный ответ в клетках-мишенях (например, снижение 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, времени введения, тканей, в которые его вводят, и физической системы доставки, в которой переносится соединение.

Термины "лечение", "процесс лечения", "лечить" и тому подобное относятся к получению желаемого фармакологического и/или физиологического эффекта. Эффект может быть профилактическим с точки зрения полного или частичного предотвращения заболевания или его симптомов и/или может быть терапевтическим с точки зрения частичного или полного излечения заболевания и/или неблагоприятного явления, связанного с этим заболеванием. В контексте данного документа термин "лечение" охватывает любое лечение заболевания у млекопитающих, в частности, у человека, и включает в себя: (a) предотвращение появления заболевания у субъекта, который может быть предрасположен к заболеванию, но у которого это заболевание еще не диагностировано; (b) ингибирование заболевания, т.е. прекращение его развития или прогрессии; и (c) облегчение заболевания, т.е. регрессию заболевания и/или облегчение одного или более симптомов заболевания. "Лечение" также подразумевает доставку агента для обеспечения фармакологического эффекта даже в отсутствие заболевания или патологического состояния. Например, "лечение" включает доставку композиции, которая может вызывать иммунный ответ или придавать иммунитет, в отсутствие болезненного состояния, например, в случае вакцинации.

Термин "гетерологичный" при применении в отношении частей нуклеиновой кислоты или белка указывает на то, что нуклеиновая кислота или белок содержит две или более субпоследовательности, которые не обнаруживаются в одинаковом соотношении друг к другу в природе. Например, нуклеиновую кислоту обычно получают рекомбинантным путем, имея две или более последовательностей из неродственных генов, организованных для получения новой функциональной нуклеиновой кислоты, например, промотор из одного источника и кодирующую область из другого источника или кодирующие области из разных источников. Точно так же гетерологичный белок указывает на то, что белок содержит две или более субпоследовательности, которые не обнаруживаются в одинаковом отношении друг к другу в природе (например, слитый белок).

В контексте настоящего документа термины "идентичность последовательностей", "процент идентичности" и "процент идентичности последовательностей" (или их синонимы, например, "99% идентичные") двух или более нуклеиновых кислот или полипептидов относятся к двум или более последовательностям или подпоследовательностям, которые являются одинаковыми или имеют определенный процент нуклеотидов или аминокислотных остатков, которые являются одинаковыми, при сравнении и сопоставлении (внесении гэпов при необходимости) для максимального соответствия, не учитывая какие-либо консервативные аминокислотные замены в качестве части идентичности последовательностей. Процент идентичности можно определять с помощью программного обеспечения или алгоритма для сравнения последовательностей, или путем визуальной оценки. Различные алгоритмы и программное обеспечение, известные в данной области техники, могут применяться для получения сопоставления аминокислотных или нуклеотидных последовательностей. Подходящие программы для определения процента идентичности последовательностей включают, например, набор программ BLAST, доступный на веб-сайте BLAST Национального центра биотехнологической информации правительства США. Сравнение двух последовательностей можно проводить с помощью алгоритма BLASTN или BLASTP. BLASTN применяют для сравнения последовательностей нуклеиновых кислот, тогда как BLASTP применяют для сравнения аминокислотных последовательностей. ALIGN, ALIGN-2 (Genentech, Южный Сан-Франциско, штат Калифорния) или MegAlign, доступные от компании DNASTAR, являются дополнительными общедоступными программами, которые можно использовать для сопоставления последовательностей. Специалист в данной области техники может определить соответствующие параметры для максимального сопоставления с помощью специального программного обеспечения для сопоставления. В некоторых вариантах осуществления применяются параметры по умолчанию программного обеспечения для сопоставления.

В контексте настоящего документа термин "вариант" охватывает, помимо прочего, белки, антитела или слитые белки, которые содержат аминокислотную последовательность, которая отличается от аминокислотной последовательности эталонного белка, антитела или слитого белка посредством одной или более замен, делеций и/или добавлений в определенных положениях внутри или рядом с аминокислотной последовательностью эталонного антитела, белка или слитого белка. Вариант может содержать одну или более консервативных замен в своей аминокислотной последовательности в сравнении с аминокислотной последовательностью эталонного антитела. Консервативные замены могут включать, например,

замену аналогично заряженных или незаряженных аминокислот. Вариант сохраняет способность специфически связываться с антигеном эталонного антитела, белка или слитого белка. Термин вариант также включает пегилированные антитела или белки.

Под термином "инфильтрирующие опухоль лимфоциты" или "TIL" в настоящем документе подразумевается популяция клеток, первоначально полученных в виде белых кровяных клеток, которые покинули кровоток субъекта и мигрировали в опухоль. TIL включают, помимо прочего, цитотоксические Т-клетки $CD8^+$ (лимфоциты), Т-клетки Th1 и Th7 $CD4^+$, естественные клетки-киллеры, дендритные клетки и макрофаги M1. TIL включают как первичные, так и вторичные TIL. "Первичные TIL" - это те TIL, которые получены из образцов тканей пациента, как указано в настоящем документе (иногда называемые "свежеполученными" или "свежевыделенными"), а "вторичные TIL" - это любые популяции клеток TIL, которые были размножены или пролиферированы, как описано в настоящем документе, включая, помимо прочего, суммарные TIL, размноженные TIL ("REP TIL"), а также "reREP TIL", как описано в настоящем документе. reREP TIL могут включать в себя, например, вторые TIL размножения или вторые дополнительные TIL размножения (такие как, например, описанные на этапе D на фиг. 2A и/или 9, включая TIL, называемые reREP TIL).

TIL обычно можно определить либо биохимически, используя маркеры клеточной поверхности, либо функционально, по их способности проникать в опухоли и влиять на лечение. TIL обычно можно классифицировать по экспрессии одного или более из следующих биомаркеров: CD4, CD8, TCRαβ, CD27, CD28, CD56, CCR7, CD45Ra, CD95, PD-1 и CD25. Дополнительно, и альтернативно, TIL можно функционально определить инфильтрировать ли солидные опухоли при повторном введении пациенту. TIL могут дополнительно характеризоваться активностью - например, TIL могут считаться активными, если, например, высвобождение интерферона (IFN) составляет более около 50 пг/мл, более около 100 пг/мл, более около 150 пг/мл или более около 200 пг/мл. TIL могут считаться активными, если, например, высвобождение интерферона (IFNγ) составляет более около 50 пг/мл, более около 100 пг/мл, более около 150 пг/мл или более около 200 пг/мл, более около 300 пг/мл, более приблизительно 400 пг/мл, более приблизительно 500 пг/мл, более приблизительно 600 пг/мл, более приблизительно 700 пг/мл, более приблизительно 800 пг/мл, более около 900 пг/мл, более около 1000 пг/мл.

Предполагается, что термины "фармацевтически приемлемый носитель" или "фармацевтически приемлемый эксципиент" 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 эксципиентов для активных фармацевтических ингредиентов хорошо известно в данной области техники. За исключением случаев, когда какой-либо обычный фармацевтически приемлемый носитель или фармацевтически приемлемый эксципиент несовместим с активным фармацевтическим ингредиентом, предполагается его применение в терапевтических композициях по настоящему изобретению. Дополнительные активные фармацевтические ингредиенты, такие как другие лекарственные средства, также могут быть включены в описанные композиции и способы.

Термины "около" и "приблизительно" означают значение в пределах статистически значимого диапазона. Такой диапазон может находиться в пределах порядка величины, предпочтительно в пределах 50%, более предпочтительно в пределах 20%, еще более предпочтительно в пределах 10% и еще более предпочтительно в пределах 5% от заданного значения или диапазона. Допустимое изменение, охватываемое терминами "около" или "приблизительно", зависит от конкретной изучаемой системы и может быть легко оценено специалистом в данной области техники. Более того, в контексте настоящего документа термины "около" и "приблизительно" означают, что размеры, составы, параметры, формы и другие величины и характеристики не должны быть точными, но могут быть приблизительными и/или большими или меньшими, в случае необходимости, отражая отклонения, коэффициенты перевода, округления, погрешности измерений и т.п., а также другие факторы, известные специалистам в данной области техники. В общем случае размер, состав, параметр, форма или другая величина или характеристика описываются в терминах "около" или "приблизительно", вне зависимости от того, указано это конкретным образом или нет. Следует отметить, что описанные компоновки могут применяться в вариантах осуществления самых разных размеров и форм.

Переходные термины "содержащий", "состоящий по существу из" и "состоящий из" при применении в прилагаемой формуле изобретения в исходной и измененной форме определяют объем формулы изобретения в отношении того, какие неуказанные дополнительные элементы формулы изобретения или этапы, если таковые имеются, исключаются из объема формулы изобретения. Предполагается, что термин "содержащий" является включающим или неограничивающим и не исключает каких-либо дополнительных, неуказанных элементов, способов, этапов или материалов. Термин "состоящий из" исключает любой элемент, этап или материал, кроме тех, которые указаны в формуле изобретения, и, в последнем случае, примеси, обычно связанные с указанным(и) материалом(ами). Термин "состоящий по существу из" ограничивает объем формулы изобретения указанными элементами, этапами или материалом(ами), а также теми, которые существенно не влияют на основную(ые) и новую(ые) характеристику(и) заявлен-

ного изобретения. Все описанные в настоящем документе композиции, способы и наборы, которые воплощают настоящее изобретение, в альтернативных вариантах осуществления могут быть более конкретно определены любым из переходных терминов "содержащий", "состоящий по существу из" и "состоящий из".

II. Процессы производства TIL (варианты осуществления процессов GEN3).

Не ограничиваясь какой-либо конкретной теорией, считается, что инициирующее первое размножение, которое инициирует активацию Т-клеток, с последующим быстрым вторым размножением, которое повышает активацию Т-клеток, как описано в способах по настоящему изобретению, позволяет получать размноженные Т-клетки, которые сохраняют "более молодой" фенотип, и, как таковые, размноженные Т-клетки по настоящему изобретению, как ожидается, будут проявлять большую цитотоксичность в отношении раковых клеток, чем Т-клетки, размноженные другими способами. В частности, считается, что активация Т-клеток, которая инициируется воздействием антитела к CD3 (например, OKT-3), IL-2 и необязательно антигенпрезентирующих клеток (APC), а затем усиливается последующим воздействием дополнительного антитела к CD-3 (например, OKT-3), IL-2 и APC, как указано в способах по настоящему изобретению, ограничивает или предотвращает созревание Т-клеток в культуре, давая популяцию Т-клеток с менее зрелым фенотипом, Т-клетки которого меньше истощаются при размножении в культуре и проявляют большую цитотоксичность в отношении раковых клеток. В некоторых вариантах осуществления этап быстрого второго размножения разделен на множество этапов для достижения повышающего масштабирования культуры за счет: (a) выполнения быстрого второго размножения путем культивирования Т-клеток в мелкомасштабной культуре в первом контейнере, например, контейнере G-REX 100MCS, в течение периода примерно от 3 до 4 дней, а затем (b) осуществления переноса Т-клеток в мелкомасштабной культуре во второй контейнер большего размера, чем первый контейнер, например, контейнер G-REX 500MCS, и культивирования Т-клеток из мелкомасштабной культуры в культуре большего масштаба во втором контейнере в течение периода от около 4 до 7 дней. В некоторых вариантах осуществления этап быстрого размножения разделен на множество этапов для достижения понижающего масштабирования культуры за счет: (a) выполнения быстрого второго размножения путем культивирования Т-клеток в первой мелкомасштабной культуре в первом контейнере, например, контейнере G-REX 100MCS, в течение от около 3 до 4 дней, а затем (b) осуществления переноса и распределения Т-клеток из первой мелкомасштабной культуры в и среди по меньшей мере 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 вторых контейнеров, равных по размеру первому контейнеру, причем в каждом втором контейнере часть Т-клеток из первой мелкомасштабной культуры, перенесенную в такой второй контейнер, культивируют во второй мелкомасштабной культуре в течение периода от около 4 до 7 дней. В некоторых вариантах осуществления этап быстрого размножения разделен на множество этапов для достижения понижающего и повышающего масштабирования культуры за счет: (a) выполнения быстрого второго размножения путем культивирования Т-клеток в мелкомасштабной культуре в первом контейнере, например, контейнере G-REX 100MCS, в течение периода от около 3 до 4 дней, а затем (b) осуществления переноса и распределения Т-клеток из мелкомасштабной культуры в и среди по меньшей мере 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 вторых контейнеров, которые больше по размеру, чем первый контейнер, например, контейнеров G-REX 500MCS, причем в каждом втором контейнере часть Т-клеток из маломасштабной культуры, перенесенной в такой второй контейнер, культивируют в культуре большего масштаба в течение периода о около 4 до 7 дней. В некоторых вариантах осуществления этап быстрого размножения разделен на множество этапов для достижения понижающего и повышающего масштабирования культуры за счет: (a) выполнения быстрого второго размножения путем культивирования Т-клеток в маломасштабной культуре в первом контейнере, например, контейнере G-REX 100MCS, в течение около 4 дней, а затем (b) осуществления переноса и распределения Т-клеток из мелкомасштабной культуры в и среди 2, 3 или 4 вторых контейнеров, которые больше по размеру, чем первый контейнер, например, контейнеров G-REX 500MCS, причем в каждом втором контейнере часть Т-клеток из маломасштабной культуры, перенесенной в такой второй контейнер, культивируют в культуре большего масштаба в течение около 5 дней.

Иллюстративный процесс TIL, известный как процесс 3 (также называемый в настоящем документе GEN3), содержащий некоторые из этих признаков, изображен на фиг. 2A и 2C и/или 9, и некоторые из преимуществ этого варианта осуществления настоящего изобретения в сравнении с процессом 2A описаны на фиг. 2B. Два варианта осуществления процесса 3 показаны на фиг. 2C. Процесс 2A или Gen 2 также описан в публикации патента США № 2018/.0280436, которая полностью включена в настоящий документ посредством ссылки. Процесс 3 или Gen 3 также описан в международной патентной заявке № PCT/US2019/059718, полностью включенной в настоящий документ посредством ссылки, а также на фиг. 5, 6, 8, 9, 10 и 11, представленных в настоящей заявке.

В некоторых вариантах осуществления быстрое второе размножение выполняют после того, как активация Т-клеток, вызванная инициирующим первым размножением, начинает снижаться, ослабевать, затухать или уменьшаться.

В некоторых вариантах осуществления быстрое второе размножение проводят после того, как активация Т-клеток, вызванная инициирующим первым размножением, уменьшилась на точно или приблизи-

тельно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100%.

В некоторых вариантах осуществления быстрое второе размножение выполняют после того, как активация Т-клеток, вызванная инициирующим первым размножением, уменьшилась на некоторое процентное значение в диапазоне от около 1% до 100%.

В некоторых вариантах осуществления быстрое второе размножение выполняют после того, как активация Т-клеток, вызванная инициирующим первым размножением, уменьшилась на процентное значение в диапазоне от около 1% до 10%, от 10% до 20%, от 20% до 30%, от 30% до 40%, от 40% до 50%, от 50% до 60%, от 60% до 70%, от 70% до 80%, от 80% до 90% или от 90% до 100%.

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

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

В некоторых вариантах осуществления снижение активации Т-клеток, вызванной инициирующим первым размножением, определяется снижением количества гамма-интерферона, высвобождаемого Т-клетками в ответ на стимуляцию антигеном. Снижение количества гамма-интерферона, высвобождаемого Т-клетками на около 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70% и/или 75% в сравнении с исходным или контрольным уровнем гамма-интерферона указывает на снижение активации Т-клеток. Снижение количества гамма-интерферона, высвобождаемого Т-клетками, до менее 200 пг/мл, менее 250 пг/мл, менее 300 пг/мл, менее 350 пг/мл, менее 400 пг/мл, менее 450 пг/мл, менее 500 пг/мл, менее 550 пг/мл, менее 600 пг/мл, менее 650 пг/мл, менее 700 пг/мл, менее 750 пг/мл, менее 800 пг/мл, менее 850 пг/мл, менее 900 пг/мл, менее 950 пг/мл или менее 1000 пг/мл указывает на снижение активации Т-клеток.

В некоторых вариантах осуществления инициирующее первое размножение Т-клеток выполняют в течение периода вплоть до или около 7 дней или около 8 дней.

В некоторых вариантах осуществления инициирующее первое размножение Т-клеток выполняют в течение периода вплоть до или около 1 дня, 2 дней, 3 дней, 4 дней, 5 дней, 6 дней, 7 дней или 8 дней.

В некоторых вариантах осуществления инициирующее первое размножение Т-клеток выполняют в течение в течение 1 дня, 2 дней, 3 дней, 4 дней, 5 дней, 6 дней, 7 дней или 8 дней.

В некоторых вариантах осуществления быстрое второе размножение Т-клеток выполняют в течение периода вплоть до или около 11 дней.

В некоторых вариантах осуществления быстрое второе размножение Т-клеток выполняют в течение периода вплоть до или около 1 дня, 2 дней, 3 дней, 4 дней, 5 дней, 6 дней, 7 дней, 8 дней, 9 дней, 10 дней или 11 дней.

В некоторых вариантах осуществления быстрое второе размножение Т-клеток выполняют в течение в течение 1 дня, 2 дней, 3 дней, 4 дней, 5 дней, 6 дней, 7 дней, 8 дней, 9 дней, 10 дней или 11 дней.

В некоторых вариантах осуществления инициирующее первое размножение Т-клеток выполняют в течение периода от 1 дня или около того до 7 дней или около того, а быстрое второе размножение Т-клеток выполняют в течение периода от 1 дня или около того до 11 дней или около того.

В некоторых вариантах осуществления инициирующее первое размножение Т-клеток выполняют в течение периода времени вплоть до или около 1 дня, 2 дней, 3 дней, 4 дней, 5 дней, 6 дней, 7 дней или 8 дней, а быстрое второе размножение Т-клеток осуществляют в течение периода вплоть до или около 1 дня, 2 дней, 3 дней, 4 дней, 5 дней, 6 дней, 7 дней, 8 дней, 9 дней, 10 дней или 11 дней.

В некоторых вариантах осуществления инициирующее первое размножение Т-клеток выполняют в течение периода от 1 дня или около того до 8 дней или около того, а быстрое второе размножение Т-клеток выполняют в течение периода от 1 дня или около того до 9 дней или около того.

В некоторых вариантах осуществления инициирующее первое размножение Т-клеток выполняют в течение 8 дней, а быстрое второе размножение Т-клеток выполняют в течение 9 дней.

В некоторых вариантах осуществления инициирующее первое размножение Т-клеток выполняют в течение периода от 1 дня или около того до 7 дней или около того, а быстрое второе размножение Т-клеток выполняют в течение периода от 1 дня или около того до 9 дней или около того.

В некоторых вариантах осуществления инициирующее первое размножение Т-клеток выполняют в

течение 7 дней, а быстрое второе размножение Т-клеток выполняют в течение 9 дней.

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

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

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

В некоторых вариантах осуществления Т-клетки получают от донора, страдающего от рака.

В некоторых вариантах осуществления Т-клетки представляют собой TIL, полученные из опухоли, иссеченной от пациента, страдающего от рака.

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

В некоторых вариантах осуществления Т-клетки представляют собой PBL, полученные из мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC) от донора. В некоторых вариантах осуществления донор страдает раком. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой рак, выбранный из группы, состоящей из меланомы, рака яичников, рака эндометрия, рака щитовидной железы, колоректального рака, рака шейки матки, немелкоклеточного рака легкого (NSCLC), рака легких, рака мочевого пузыря, рака молочной железы, рака, вызванного вирусом папилломы человека, рака головы и шеи (включая плоскоклеточный рак головы и шеи (HNSCC)), глиобластомы (включая GBM), рака желудочно-кишечного тракта, рака почки и почечно-клеточного рака. В некоторых вариантах осуществления рак выбран из группы, состоящей из меланомы, рака яичников, рака шейки матки, немелкоклеточного рака легкого (NSCLC), рака легких, рака мочевого пузыря, рака молочной железы, рака, вызванного вирусом папилломы человека, рака головы и шеи (включая плоскоклеточный рак головы и шеи (HNSCC)), глиобластомы (включая GBM), рака желудочно-кишечного тракта, рака почки и почечно-клеточного рака. В некоторых вариантах осуществления донор страдает опухолью. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения опухоль представляет собой гемобластоз. В некоторых вариантах осуществления опухоль представляет собой солидную опухоль. В некоторых вариантах осуществления донор страдает гематологическим злокачественным новообразованием.

В некоторых аспектах настоящего изобретения иммунные эффекторные клетки, например, Т-клетки, могут быть получены из единицы крови, собранной у субъекта с помощью ряда методик, известных специалисту в данной области техники, таких как отделение FICOLL. В одном предпочтительном аспекте клетки из циркулирующей крови индивидуума получают посредством афереза. Продукт афереза, как правило, содержит лимфоциты, включая Т-клетки, моноциты, гранулоциты, В-клетки, другие ядерные белые кровяные клетки, красные кровяные клетки и тромбоциты. В одном аспекте клетки, собранные посредством афереза, могут быть промыты для удаления фракции плазмы и необязательно помещения клеток в соответствующий буфер или среду для дальнейших этапов обработки. В одном варианте осуществления клетки промывают фосфатно-солевым буфером (PBS). В альтернативном варианте осуществления раствор для промывания не содержит кальций и может не содержать магний или может не содержать многие, если не все, двухвалентные катионы. В одном аспекте Т-клетки выделяют из лимфоцитов периферической крови посредством лизиса эритроцитов и деплеции моноцитов, например, посредством центрифугирования в градиенте PERCOLL или противоточной центрифужной элютриации.

В некоторых вариантах осуществления Т-клетки представляют собой PBL, выделенные из цельной крови или продукта афереза, обогащенного лимфоцитами донора. В некоторых вариантах осуществления донор страдает раком. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой рак, выбранный из группы, состоящей из меланомы, рака яичников, рака эндометрия, рака щитовидной железы, колоректального рака, рака шейки матки, немелкоклеточного рака легкого (NSCLC), рака легких, рака мочевого пузыря, рака молочной железы, рака, вызванного вирусом папилломы человека, рака головы и шеи (включая плоскоклеточный рак головы и шеи (HNSCC)), глиобластомы (включая GBM), рака желудочно-кишечного тракта, рака почки и почечно-клеточного рака. В некоторых вариантах осуществления рак выбран из группы, состоящей из меланомы, рака яичников, рака шейки матки, немелкоклеточного рака легкого (NSCLC), рака легких, рака мочевого пузыря, рака молочной железы, рака, вызванного вирусом папилломы человека, рака головы и шеи (включая плоскоклеточный рак головы и шеи (HNSCC)), глиобластомы (включая GBM), рака желудочно-кишечного тракта, рака почки и почечно-клеточного рака. В некоторых вариантах осуществления донор страдает опухолью. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения опухоль представляет собой гемобластоз. В некоторых вариантах осуществления опухоль представляет собой солидную опухоль. В некоторых вариантах осуществления донор страдает гематологическим злокачественным новообразованием. В некоторых вариантах осуществления PBL выделяют из цельной крови или продукта афереза, обогащенного лимфоцитами, способами положительной или отрицательной селекции, т.е. путем удаления PBL с помощью маркера(ов), например, $CD3^+$ $CD45^+$, для Т-клеточного фенотипа или удаления клетки не-Т-клеточного фенотипа, оставляя PBL. В других вариантах осуществления PBL выделяют посредством градиентного центрифугирования. После выделения PBL из донорской ткани инициирующее первое размножение PBL можно инициировать путем посева

подходящего количества выделенных PBL (в некоторых вариантах осуществления приблизительно 1×10^7 PBL) в культуру инициирующего первого размножения в соответствии с этапом инициирующего первого размножения по любому из способов, описанных в настоящем документе.

Как рассмотрено и в общих чертах описано в настоящем документе, TIL берут из образца пациента и подвергают манипуляциям для размножения их количества до трансплантации пациенту с помощью описанного в настоящем документе процесса размножения TIL. В некоторых вариантах осуществления TIL могут быть необязательно подвергнуты генетическим манипуляциям, как обсуждается ниже. В некоторых вариантах осуществления TIL могут быть подвергнуты криоконсервации до или после размножения. После размораживания их также можно повторно стимулировать для повышения их метаболизма до инфузии в организм пациента.

В некоторых вариантах осуществления инициирующее первое размножение (включая процессы, называемые в настоящем документе предварительным быстрым размножением (Pre-REP), а также процессы, показанные на фиг. 2A как этап B) сокращается до 1-8 дней, а быстрое второе размножение (включая процессы, называемые в настоящем документе протоколом быстрого размножения (REP), а также процессы, показанные на фиг. 2A как этап D) сокращается до 1-9 дней, как подробно описано ниже, а также в примерах и на фигурах. В некоторых вариантах осуществления инициирующее первое размножение (включая процессы, называемые в настоящем документе предварительным быстрым размножением (Pre-REP), а также процессы, показанные на фиг. 2A как этап B) сокращается до 1-8 дней, а быстрое второе размножение (включая процессы, называемые в настоящем документе протоколом быстрого размножения (REP), а также процессы, показанные на фиг. 2A как этап D) сокращается до 1-8 дней, как подробно описано ниже, а также в примерах и на фигурах. В некоторых вариантах осуществления инициирующее первое размножение (включая процессы, называемые в настоящем документе предварительным быстрым размножением (Pre-REP), а также процессы, показанные на фиг. 2A как этап B) сокращается до 1-7 дней, а быстрое второе размножение (включая процессы, называемые в настоящем документе протоколом быстрого размножения (REP), а также процессы, показанные на фиг. 2A как этап D) сокращается до 1-9 дней, как подробно описано ниже, а также в примерах и на фигурах. В некоторых вариантах осуществления инициирующее первое размножение (включая процессы, называемые в настоящем документе предварительным быстрым размножением (Pre-REP), а также процессы, показанные на фиг. 2A как этап B) составляет от 1 до 7 дней, а быстрое второе размножение (включая процессы, называемые в настоящем документе протоколом быстрого размножения (REP), а также процессы, показанные на фиг. 2A как этап D) составляет от 1 до 10 дней, как подробно описано ниже, а также в примерах и на фигурах. В некоторых вариантах осуществления инициирующее первое размножение (например, размножение, описанное как этап B на фиг. 2A) сокращается до 8 дней, а быстрое второе размножение (например, размножение, как описано на этапе D на фиг. 2A) составляет от 7 до 9 дней. В некоторых вариантах осуществления инициирующее первое размножение (например, размножение, описанное как этап B на фиг. 2A) составляет 8 дней, а быстрое второе размножение (например, размножение, как описано на этапе D на фиг. 2A) составляет от 8 до 9 дней. В некоторых вариантах осуществления инициирующее первое размножение (например, размножение, описанное как этап B на фиг. 2A) сокращается до 7 дней, а быстрое второе размножение (например, размножение, как описано на этапе D на фиг. 2A) составляет от 7 до 8 дней. В некоторых вариантах осуществления инициирующее первое размножение (например, размножение, описанное как этап B на фиг. 2A) сокращается до 8 дней, а быстрое второе размножение (например, размножение, как описано на этапе D на фиг. 2A) составляет 8 дней. В некоторых вариантах осуществления инициирующее первое размножение (например, размножение, описанное как этап B на фиг. 2A) составляет 8 дней, а быстрое второе размножение (например, размножение, как описано на этапе D на фиг. 2A) составляет 9 дней. В некоторых вариантах осуществления инициирующее первое размножение (например, размножение, описанное как этап B на фиг. 2A) составляет 8 дней, а быстрое второе размножение (например, размножение, как описано на этапе D на фиг. 2A) составляет 10 дней. В некоторых вариантах осуществления инициирующее первое размножение (например, размножение, описанное как этап B на фиг. 2A) составляет 7 дней, а быстрое второе размножение (например, размножение, как описано на этапе D на фиг. 2A) составляет от 7 до 10 дней. В некоторых вариантах осуществления инициирующее первое размножение (например, размножение, описанное как этап B на фиг. 2A) составляет 7 дней, а быстрое второе размножение (например, размножение, как описано на этапе D на фиг. 2A) составляет от 8 до 10 дней. В некоторых вариантах осуществления инициирующее первое размножение (например, размножение, описанное как этап B на фиг. 2A) составляет 7 дней, а быстрое второе размножение (например, размножение, как описано на этапе D на фиг. 2A) составляет от 9 до 10 дней. В некоторых вариантах осуществления инициирующее первое размножение (например, размножение, описанное как этап B на фиг. 2A) сокращается до 7 дней, а быстрое второе размножение (например, размножение, как описано на этапе D на фиг. 2A) составляет от 7 до 9 дней. В некоторых вариантах осуществления сочетание инициирующего первого размножения и быстрого второго размножения (например, размножений, описанных как этап B и этап D на фиг. 2A) составляет 14-16 дней, как подробно описано ниже, а также в примерах и на фигурах. В частности, считается, что некоторые варианты осуществления настоящего изобретения включают этап инициирующего первого размножения, на котором TIL активи-

руют путем воздействия антитела к CD3, например, OKT-3, в присутствии IL-2 или воздействия антигена в присутствии по меньшей мере IL-2 и антитела к CD3, например, OKT-3. В некоторых вариантах осуществления TIL, которые активируют на этапе инициирующего первого размножения, как описано выше, представляют собой первую популяцию TIL, т.е. представляют собой популяцию первичных клеток.

В некоторых вариантах осуществления TIL не сохраняются после первого размножения и до второго размножения, а TIL переходят непосредственно ко второму размножению (например, в некоторых вариантах осуществления при переходе от этапа B к этапу D нет сохранения как показано на фиг. 2A). В некоторых вариантах осуществления переход происходит в закрытой системе, как описано в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления TIL из первого размножения, второй популяции TIL, переходят непосредственно ко второму размножению без переходного периода.

В некоторых вариантах осуществления первое размножение, например, этап B согласно фиг. 2A, выполняют в биореакторе закрытой системы. В некоторых вариантах осуществления для размножения TIL применяют закрытую систему, как описано в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления применяют отдельный биореактор. В некоторых вариантах осуществления отдельным применяемым биореактором является, например, G-REX-10 или G-REX-100. В некоторых вариантах осуществления биореактор закрытой системы представляет собой отдельный биореактор.

Обозначения A, B, C и т.д. "этапа", указанные в настоящем документе, относятся к неограничивающему примеру на фиг. 2A и к некоторым неограничивающим вариантам осуществления, описанным в настоящем документе. Порядок этапов ниже и на фиг. 2A является иллюстративным, и любая комбинация или порядок этапов, а также дополнительные этапы, повторение этапов и/или пропуск этапов предусмотрены настоящей заявкой и описанными в настоящем документе способами.

A. Анализ на жизнеспособность клеток.

Анализ на жизнеспособность клеток можно проводить после инициирующего первого размножения (иногда называемого начальным массовым размножением) с помощью стандартных анализов, известных в данной области техники. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления способ включает выполнение анализа на жизнеспособность клеток после инициирующего первого размножения. В некоторых вариантах осуществления анализ на жизнеспособность клеток может быть выполнен после второго размножения (например, после REP), а также после окончательного сбора. Например, для образца суммарных TIL можно проводить анализ с трипановым синим, который избирательно метит мертвые клетки и позволяет оценивать жизнеспособность. Другие анализы для тестирования жизнеспособности могут включать, помимо прочего, анализ с аламаровым синим и анализ MTT.

1. Количество клеток, жизнеспособность, проточная цитометрия.

В некоторых вариантах осуществления измеряют количество и/или жизнеспособность клеток. Экспрессию маркеров, таких как, но без ограничения, CD3, CD4, CD8 и CD56, а также любых других, раскрытых или описанных в настоящем документе, можно измерять методом проточной цитометрии с антителами, например, но без ограничения, теми, которые коммерчески доступны от компании BD Biosciences (BD Biosciences, Сан-Хосе, штат Калифорния), с помощью проточного питометра FACSCanto™ (BD Biosciences). Клетки можно подсчитывать вручную с помощью одноразового гемоцитометра C-chip (VWR, Батавия, штат Иллинойс), а жизнеспособность можно оценивать любым методом, известным в данной области техники, включая, помимо прочего, окрашивание трипановым синим. Жизнеспособность клеток можно также анализировать на основе USSN 15/863634, полностью включенного в настоящий документ посредством ссылки. Жизнеспособность клеток также можно анализировать на основе публикации патента США № 2018/0280436 или публикации международного патента № WO/2018/081473, обе из которых полностью включены в настоящий документ для всех целей.

В некоторых случаях популяцию суммарных TIL можно криоконсервировать немедленно с помощью протоколов, описанных ниже. Альтернативно популяция суммарных TIL может быть подвергнута REP, а затем криоконсервирована, как описано ниже. Аналогично, в случае, когда в терапии будут применяться генетически модифицированные TIL, популяции суммарных или REP TIL можно подвергать генетическим модификациям для подходящего лечения.

III. Процессы производства TIL (варианты процесса 2A).

Иллюстративный процесс TIL, известный как процесс 2A, включающий некоторые из этих признаков, изображен на фиг. 5, а некоторые отличия и преимущества этого варианта осуществления настоящего изобретения в сравнении с процессом 1C описаны на фиг. 6, а также на фиг. 11. Процесс 1C показан для сравнения на фиг. 6, 7 и 10. Вариант осуществления процесса 2A показан на фиг. 6, а также на фиг. 5, 9, 10 и 11. На фиг. 10 и 11 дополнительно представлен иллюстративный процесс 2A в сравнении с иллюстративным процессом 1C.

Как описано в настоящем документе, данное изобретение может включать этап, относящийся к повторной стимуляции криоконсервированных TIL для повышения их метаболической активности и, следовательно, относительного здоровья перед трансплантацией пациенту, а также способы проверки указанного метаболического здоровья. Как в общих чертах описано в настоящем документе, TIL обычно берут из образца пациента и подвергают манипуляциям для увеличения их количества до трансплантации пациенту. В некоторых вариантах осуществления TIL могут быть необязательно подвергнуты гене-

тическим манипуляциям, как обсуждается ниже.

В некоторых вариантах осуществления TIL могут быть подвергнуты криоконсервации. После размораживания их также можно повторно стимулировать для повышения их метаболизма до инфузии в организм пациента.

В некоторых вариантах осуществления первое размножение (включая процессы, называемые pre-REP, а также процессы, показанные на фиг. 9 как этап A) сокращается до 3-14 дней, а второе размножение (включая процессы, называемые REP, а также процессы, показанные на фиг. 9 как этап B), сокращается до 7-14 дней, как подробно описано ниже, а также в примерах и на фигурах. В некоторых вариантах осуществления первое размножение (например, размножение, описанное как этап B на фиг. 9) сокращается до 11 дней, а второе размножение (например, размножение, как описано на этапе D на фиг. 9) сокращается до 11 дней, как описано в примерах и показано на фиг. 5, 6, 8, 9, 10 и 11. В некоторых вариантах осуществления сочетание первого размножения и второго размножения (например, размножений, описанных как этап B и этап D на фиг. 9) сокращается до 22 дней, как подробно описано ниже, а также в примерах и на фигурах.

Обозначения A, B, C и т.д. "этапа", указанные ниже, относятся к фиг. 9 и к некоторым вариантам осуществления, описанным в настоящем документе. Порядок этапов ниже и на фиг. 9 является иллюстративным, и любая комбинация или порядок этапов, а также дополнительные этапы, повторение этапов и/или пропуск этапов предусмотрены настоящей заявкой и описанными в настоящем документе способами.

A. Этап A. Получение образца опухоли пациента.

В общем случае TIL первоначально получают из образца опухоли пациента, а затем размножают до большей популяции для дальнейших манипуляций, как описано в настоящем документе, необязательно подвергают криоконсервации, повторно стимулируют, как описано в настоящем документе, и необязательно оценивают фенотип и метаболические параметры как показатель здоровья TIL.

Образец опухоли пациента может быть получен способами, известными в данной области техники, обычно посредством хирургической резекции, пункционной биопсии, толстоигольной биопсии, небольшой биопсии или других способов получения образца, который содержит смесь опухолевых и TIL-клеток. В некоторых вариантах осуществления применяется взятие образцов из нескольких поражений. В некоторых вариантах осуществления хирургическая резекция, пункционная биопсия, толстоигольная биопсия, небольшая биопсия или другие способы получения образца, который содержит смесь опухолевых и TIL-клеток, включают взятие образцов из нескольких поражений (т.е. взятие образцов из одного или более мест и/или участков расположения опухоли у пациента, а также из одной или более опухолей в том же месте или в непосредственной близости). В общем случае образец опухоли может быть взят из любой солидной опухоли, включая первичные опухоли, инвазивные опухоли или метастатические опухоли. Образец опухоли также может представлять собой жидкую опухоль, такую как опухоль, полученная из гематологического злокачественного новообразования. Солидная опухоль может быть из легочной ткани. В некоторых вариантах осуществления полезные TIL получают из немелкоклеточной карциномы легкого (NSCLC).

После получения образец опухоли обычно фрагментируют с помощью острого рассечения на мелкие кусочки объемом от 1 до около 8 $мм^3$, причем особенно пригодными являются кусочки объемом около 2-3 $мм^3$. В некоторых вариантах осуществления TIL культивируют из этих фрагментов с помощью ферментативных расщеплений опухоли. Такие расщепления опухоли могут быть получены путем инкубации в ферментативной среде (например, в буфере Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640, 2 мМ глутамата, 10 мкг/мл гентамицина, 30 единиц/мл ДНКазы и 1,0 мг/мл коллагеназы) с последующей механической диссоциацией (например, с помощью тканевого диссоциатора). Расщепления опухоли можно получить, поместив опухоль в ферментативную среду и механически диссоциировав опухоль в течение приблизительно 1 мин с последующей инкубацией в течение 30 мин при 37°C в 5% CO_2 с последующими повторными циклами механической диссоциации и инкубации в вышеуказанных условиях, пока не останутся только небольшие кусочки ткани. В конце этого процесса, если клеточная суспензия содержит большое количество красных кровяных клеток или мертвых клеток, для удаления этих клеток можно провести разделение по градиенту плотности с помощью разветвленного гидрофильного полисахарида FICOLL. Можно применять альтернативные способы, известные в данной области техники, такие как способы, описанные в публикации заявки на патент США № 2012/0244133 A1, описание которой включено в настоящий документ посредством ссылки. Любой из вышеуказанных способов можно применять в любом из вариантов осуществления, описанных в настоящем документе, для способов размножения TIL или способов лечения рака.

Смеси ферментов, диссоциирующих опухоль, могут включать один или более диссоциирующих (расщепляющих) ферментов, таких как, помимо прочего, коллагеназа (включая любую смесь или тип коллагеназы), Accutase™, Accumax™, гиалуронидаза, нейтральная протеаза (диспаза), химотрипсин, химопапаин, трипсин, казеиназа, эластаза, папаин, протеаза типа XIV (проназа), дезоксирибонуклеаза I (ДНаза), ингибитор трипсина, любой другой диссоциирующий или протеолитический фермент и любая их комбинация.

В некоторых вариантах осуществления диссоциирующие ферменты восстанавливают из лиофили-

зированных ферментов. В некоторых вариантах осуществления лиофилизированные ферменты восстанавливают в некотором количестве стерильного буфера, такого как HBSS.

В некоторых случаях коллагеназу (например, коллагеназу не животного происхождения типа 1) восстанавливают в 10 мл стерильного HBSS или другого буфера. Лиофилизированный исходный фермент может иметь концентрацию 2892 ед. PZ/флакон. В некоторых вариантах осуществления коллагеназу восстанавливают в буфере объемом от 5 до 15 мл. В некоторых вариантах осуществления после восстановления концентрация раствора коллагеназы находится в диапазоне от около 100 ед. PZ/мл до около 400 ед. PZ/мл, например, от около 100 ед. PZ/мл до около 400 ед. PZ/мл, от около 100 ед. PZ/мл до около 350 ед. PZ/мл, от около 100 ед. PZ/мл до около 300 ед. PZ/мл, от около 150 ед. PZ/мл до около 400 ед. PZ/мл, около 100 ед. PZ/мл, около 150 ед. PZ/мл, около 200 ед. PZ/мл, около 210 ед. PZ/мл, около 220 ед. PZ/мл, около 230 ед. PZ/мл, около 240 ед. PZ/мл, около 250 ед. PZ/мл, около 260 ед. PZ/мл, около 270 ед. PZ/мл, около 280 ед. PZ/мл, около 289,2 ед. PZ/мл, около 300 ед. PZ/мл, около 350 ед. PZ/мл или около 400 ед. PZ/мл.

В некоторых вариантах осуществления нейтральную протеазу восстанавливают в 1 мл стерильного HBSS или другого буфера. Лиофилизированный исходный фермент может иметь концентрацию 175 ед. DMC/флакон. В некоторых вариантах осуществления после восстановления концентрация раствора нейтральной протеазы находится в диапазоне от около 100 DMC/мл до около 400 DMC/мл, например, от около 100 DMC/мл до около 400 DMC/мл, от около 100 DMC/мл до около 350 DMC/мл, от около 100 DMC/мл до около 300 DMC/мл, от около 150 DMC/мл до около 400 DMC/мл, около 100 DMC/мл, около 110 DMC/мл, около 120 DMC/мл, около 130 DMC/мл, около 140 DMC/мл, около 150 DMC/мл, около 160 DMC/мл, около 170 DMC/мл, около 175 DMC/мл, около 180 DMC/мл, около 190 DMC/мл, около 200 DMC/мл, около 250 DMC/мл, около 300 DMC/мл, около 350 DMC/мл или около 400 DMC/мл.

В некоторых вариантах осуществления ДНКазу I восстанавливают в 1 мл стерильного HBSS или другого буфера. Лиофилизированный исходный фермент имел концентрацию 4 KU/флакон. В некоторых вариантах осуществления после восстановления концентрация раствора ДНКазы I находится в диапазоне от около 1 KU/мл до 10 KU/мл, например, около 1 KU/мл, около 2 KU/мл, около 3 KU/мл, около 4 KU/мл, около 5 KU/мл, около 6 KU/мл, около 7 KU/мл, около 8 KU/мл, около 9 KU/мл или около 10 KU/мл.

В некоторых вариантах осуществления раствор ферментов является переменным, и может потребоваться определение его концентрации. В некоторых вариантах осуществления можно проверить концентрацию лиофилизированного раствора. В некоторых вариантах осуществления конечное количество фермента, добавляемого к смеси для расщепления, регулируют на основе определенной концентрации раствора.

В некоторых вариантах осуществления смесь ферментов включает около 10,2 мкл нейтральной протеазы (0,36 ед. DMC/мл), 21,3 мкл коллагеназы (1,2 PZ/мл) и 250 мкл ДНКазы I (200 ЕД/мл) в объеме около 4,7 мл стерильного HBSS.

Как указано выше, в некоторых вариантах осуществления TIL получают из солидных опухолей. В некоторых вариантах осуществления солидные опухоли не фрагментированы. В некоторых вариантах солидные опухоли не фрагментированы и подвергаются ферментативному расщеплению как целые опухоли. В некоторых вариантах осуществления опухоли расщепляют в смеси ферментов, содержащей коллагеназу, ДНКазу и гиалуронидазу. В некоторых вариантах осуществления опухоли расщепляют в смеси ферментов, содержащей коллагеназу, ДНКазу и гиалуронидазу, в течение 1-2 ч. В некоторых вариантах осуществления опухоли расщепляют в смеси ферментов, содержащей коллагеназу, ДНКазу и гиалуронидазу, в течение 1-2 ч при 37°C, 5% CO_2. В некоторых вариантах осуществления опухоли расщепляют в смеси ферментов, содержащей коллагеназу, ДНКазу и гиалуронидазу, в течение 1-2 ч при 37°C, 5% CO_2 с вращением. В некоторых вариантах осуществления опухоли расщепляют в течение ночи с постоянным вращением. В некоторых вариантах осуществления опухоли расщепляют в течение ночи при 37°C, 5% CO_2 с постоянным вращением. В некоторых вариантах осуществления всю опухоль объединяют с ферментами с образованием реакционной смеси для расщепления опухоли.

В некоторых вариантах осуществления опухоль восстанавливают лиофилизированными ферментами в стерильном буфере. В некоторых вариантах осуществления буфер представляет собой стерильный HBSS.

В некоторых вариантах осуществления смесь ферментов содержит коллагеназу. В некоторых вариантах осуществления коллагеназа представляет собой коллагеназу IV. В некоторых вариантах осуществления рабочий раствор для коллагеназы представляет собой 10× рабочий раствор 100 мг/мл.

В некоторых вариантах осуществления смесь ферментов содержит ДНКазу. В некоторых вариантах осуществления рабочий раствор для ДНКазы представляет собой 10× рабочий раствор 10 000 МЕ/мл.

В некоторых вариантах осуществления смесь ферментов содержит гиалуронидазу. В некоторых вариантах осуществления рабочий раствор для гиалуронидазы представляет собой 10× рабочий раствор 10 мг/мл.

В некоторых вариантах осуществления смесь ферментов содержит 10 мг/мл коллагеназы, 1000

МЕ/мл ДНКазы и 1 мг/мл гиалуронидазы.

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

Обычно собранную клеточную суспензию называют "популяцией первичных клеток" или популяцией "свежесобранных" клеток.

В некоторых вариантах осуществления фрагментация включает физическую фрагментацию, включая, например, рассечение, а также расщепление. В некоторых вариантах осуществления фрагментация представляет собой физическую фрагментацию. В некоторых вариантах осуществления фрагментация представляет собой рассечение. В некоторых вариантах осуществления фрагментацию осуществляют посредством расщепления. В некоторых вариантах осуществления TIL можно первоначально культивировать из ферментативных расщеплений опухоли и фрагментов опухоли, полученных от пациентов. В одном варианте осуществления TIL можно первоначально культивировать из ферментативных расщеплений опухоли и фрагментов опухоли, полученных от пациентов.

В некоторых вариантах осуществления, когда опухоль представляет собой солидную опухоль, опухоль подвергается физической фрагментации после получения образца опухоли, например, на этапе A (как показано на фиг. 1). В некоторых вариантах фрагментация происходит до криоконсервации. В некоторых вариантах фрагментация происходит после криоконсервации. В некоторых вариантах осуществления фрагментация происходит после получения опухоли и при отсутствии какой-либо криоконсервации. В некоторых вариантах осуществления опухоль фрагментируют и 10, 20, 30, 40 или более фрагментов или кусочков помещают в каждый контейнер для первого размножения. В некоторых вариантах осуществления опухоль фрагментируют и 30 или 40 фрагментов или кусочков помещают в каждый контейнер для первого размножения. В некоторых вариантах осуществления опухоль фрагментируют и 40 фрагментов или кусочков помещают в каждый контейнер для первого размножения. В некоторых вариантах осуществления множественные фрагменты включают от примерно 4 до около 50 фрагментов, причем каждый фрагмент имеет объем около 27 $мм^3$. В некоторых вариантах осуществления множественные фрагменты содержат от около 30 до около 60 фрагментов с общим объемом от около 1300 $мм^3$ до около 1500 $мм^3$. В некоторых вариантах осуществления множественные фрагменты содержат около 50 фрагментов с общим объемом около 1350 $мм^3$. В некоторых вариантах осуществления множественные фрагменты содержат около 50 фрагментов общей массой от около 1 грамма до около 1,5 грамма. В некоторых вариантах осуществления множественные фрагменты содержат около 4 фрагментов.

В некоторых вариантах осуществления TIL получают из фрагментов опухоли. В некоторых вариантах осуществления фрагмент опухоли получают посредством острого рассечения. В некоторых вариантах осуществления фрагмент опухоли составляет от около 1 $мм^3$ до 10 $мм^3$. В некоторых вариантах осуществления фрагмент опухоли составляет от около 1 $мм^3$ до 8 $мм^3$. В некоторых вариантах осуществления фрагмент опухоли составляет около 1 $мм^3$. В некоторых вариантах осуществления фрагмент опухоли составляет около 2 $мм^3$. В некоторых вариантах осуществления фрагмент опухоли составляет около 3 $мм^3$. В некоторых вариантах осуществления фрагмент опухоли составляет около 4 $мм^3$. В некоторых вариантах осуществления фрагмент опухоли составляет около 5 $мм^3$. В некоторых вариантах осуществления фрагмент опухоли составляет около 6 $мм^3$. В некоторых вариантах осуществления фрагмент опухоли составляет около 7 $мм^3$. В некоторых вариантах осуществления фрагмент опухоли составляет около 8 $мм^3$. В некоторых вариантах осуществления фрагмент опухоли составляет около 9 $мм^3$. В некоторых вариантах осуществления фрагмент опухоли составляет около 10 $мм^3$. В некоторых вариантах осуществления опухоли имеют размеры 1-4 мм×1-4 мм×1-4 мм. В некоторых вариантах осуществления опухоли имеют размеры 1 мм×1 мм×1 мм. В некоторых вариантах осуществления опухоли имеют размеры 2 мм×2 мм×2 мм. В некоторых вариантах осуществления опухоли имеют размеры 3 мм×3 мм×3 мм. В некоторых вариантах осуществления опухоли имеют размеры 4 мм×4 мм×4 мм.

В некоторых вариантах осуществления опухоли резецируют, чтобы свести к минимуму количество геморрагических, некротических и/или жировых тканей на каждом кусочке. В некоторых вариантах осуществления опухоли резецируют, чтобы свести к минимуму количество геморрагических тканей на каждом кусочке. В некоторых вариантах осуществления опухоли резецируют, чтобы свести к минимуму количество некротических тканей на каждом кусочке. В некоторых вариантах осуществления опухоли резецируют, чтобы свести к минимуму количество жировых тканей на каждом кусочке.

В некоторых вариантах осуществления фрагментацию опухоли выполняют для сохранения внутренней структуры опухоли. В некоторых вариантах осуществления фрагментацию опухоли выполняют без осуществления пилящего движения скальпелем. В некоторых вариантах осуществления TIL получают из расщеплений опухоли. В некоторых вариантах осуществления расщепления опухоли получали путем инкубации в ферментативной среде, например, помимо прочего, в RPMI 1640, 2 мМ GlutaMAX, 10 мг/мл гентамицина, 30 ЕД/мл ДНКазы и 1,0 мг/мл коллагеназы, с последующей механической диссоциацией (GentleMACS, Miltenyi Biotec, Auburn, CA). После помещения опухоли в ферментативную среду опухоль можно механически диссоциировать в течение приблизительно 1 мин. Затем раствор можно инкубировать в течение 30 мин при 37°C в 5% CO_2, а затем снова механически разрушить в течение при-

близительно 1 мин. После повторной инкубации в течение 30 мин при 37°C в 5% CO_2 опухоль можно механически разрушить в третий раз в течение приблизительно 1 мин. В некоторых вариантах осуществления после третьего механического разрушения, если присутствовали большие кусочки ткани, к образцу применяли 1 или 2 дополнительных механических диссоциации с дополнительными 30 мин инкубации при 37°C в 5% CO_2 или без них. В некоторых вариантах осуществления в конце последней инкубации, если клеточная суспензия содержала большое количество красных кровяных клеток или мертвых клеток, для удаления этих клеток можно провести разделение по градиенту плотности с помощью Ficoll.

В некоторых вариантах осуществления собранная клеточная суспензия до первой стадии размножения называется "популяцией первичных клеток" или популяцией "свежесобранных" клеток.

В некоторых вариантах осуществления клетки могут быть необязательно заморожены после сбора образца и храниться в замороженном виде до начала размножения, описанного на этапе B, который более подробно описан ниже, а также проиллюстрирован на фиг. 9.

1. Т-клетки и TIL из плеврального экссудата.

В некоторых вариантах осуществления образец представляет собой образец плевральной жидкости. В некоторых вариантах осуществления источником Т-клеток или TIL для размножения в соответствии с описанными в настоящем документе способами является образец плевральной жидкости. В некоторых вариантах осуществления образец представляет собой образец, полученный из плеврального экссудата. В некоторых вариантах осуществления источником Т-клеток или TIL для размножения в соответствии с описанными в настоящем документе способами является образец, полученный из плеврального экссудата, см., например, способы, описанные в публикации патента США US 2014/0295426, полностью включенной в настоящий документ посредством ссылки для всех целей.

В некоторых вариантах осуществления можно применять любую плевральную жидкость или плевральный экссудат с подозрением на TIL и/или содержащий их. Такой образец может быть получен из первичного или метастатического рака легкого, такого как NSCLC или SCLC. В некоторых вариантах осуществления образец может представлять собой вторичные метастатические раковые клетки, происходящие из другого органа, например молочной железы, яичника, толстой кишки или предстательной железы. В некоторых вариантах осуществления образец для применения в описанных в настоящем документе способах размножения представляет собой плевральный экссудат. В некоторых вариантах осуществления образец для применения в описанных в настоящем документе способах размножения представляет собой плевральный транссудат. Другие биологические образцы могут включать другие серозные жидкости, содержащие TIL, включая, например, асцитическую жидкость из брюшной полости или жидкость из кисты поджелудочной железы. Асцитическая жидкость и плевральная жидкость содержат очень похожие химические системы; как брюшная полость, так и легкое имеют мезотелиальные линии и формы жидкости в плевральной полости и брюшной полости в одном и том же веществе при злокачественных новообразованиях, и такие жидкости в некоторых вариантах осуществления содержат TIL. В некоторых вариантах осуществления, где в описании приводится пример плевральной жидкости, те же способы могут быть выполнены с аналогичными результатами с применением асцитической или других кистозных жидкостей, содержащих TIL.

В некоторых вариантах осуществления плевральная жидкость находится в необработанном виде, непосредственно извлеченном из организма пациента. В некоторых вариантах осуществления необработанную плевральную жидкость помещают в стандартную пробирку для сбора крови, такую как пробирка с EDTA или гепарином, до этапа контактирования. В некоторых вариантах осуществления необработанную плевральную жидкость помещают в стандартную пробирку Cell Save® (Veridex) до этапа контактирования. В некоторых вариантах осуществления образец помещают в пробирку CellSave сразу после сбора у пациента, чтобы избежать уменьшения количества жизнеспособных TIL. Количество жизнеспособных TIL может значительно уменьшиться в течение 24 ч, если их оставить в необработанной плевральной жидкости даже при 4°C. В некоторых вариантах осуществления образец помещают в соответствующую пробирку для сбора в течение 1 ч, 5 ч, 10 ч, 15 ч или до 24 ч после взятия у пациента. В некоторых вариантах осуществления образец помещают в соответствующую пробирку для сбора в течение 1 ч, 5 ч, 10 ч, 15 ч или до 24 ч после взятия у пациента при 4°C.

В некоторых вариантах осуществления образец плевральной жидкости от выбранного субъекта может быть разбавлен. В одном варианте осуществления разведение составляет 1:10 плевральной жидкости к разбавителю. В другом варианте осуществления разведение составляет 1:9 плевральной жидкости к разбавителю. В другом варианте осуществления разведение составляет 1:8 плевральной жидкости к разбавителю. В другом варианте осуществления разведение составляет 1:5 плевральной жидкости к разбавителю. В другом варианте осуществления разведение составляет 1:2 плевральной жидкости к разбавителю. В другом варианте осуществления разведение составляет 1:1 плевральной жидкости к разбавителю. В некоторых вариантах осуществления разбавители включают солевой раствор, фосфатно-солевой буфер, другой буфер или физиологически приемлемый разбавитель. В некоторых вариантах осуществления образец помещают в пробирку CellSave сразу после сбора у пациента и разбавления, чтобы избежать снижения количества жизнеспособных TIL, которое может произойти в значительной степени в течение 24-48 ч, если его оставить в необработанной плевральной жидкости, даже при 4°C. В некоторых вариан-

тах осуществления образец плевральной жидкости помещают в соответствующую пробирку для сбора в течение 1 ч, 5 ч, 10 ч, 15 ч, 24 ч, 36 ч, вплоть до 48 ч после взятия у пациента. В некоторых вариантах образец плевральной жидкости помещают в соответствующую пробирку для сбора в течение 1 ч, 5 ч, 10 ч, 15 ч, 24 ч, 36 ч, вплоть до 48 ч после взятия у пациента и разведения при 4°C.

В еще одном варианте осуществления образцы плевральной жидкости концентрируют с помощью обычных способов до дальнейших этапов обработки. В некоторых вариантах осуществления эта предварительная обработка плевральной жидкости предпочтительна в обстоятельствах, когда плевральную жидкость необходимо подвергнуть криоконсервации для отправки в лабораторию, выполняющую способ, или для последующего анализа (например, позднее чем через 24-48 ч после сбора). В некоторых вариантах осуществления образец плевральной жидкости готовят путем центрифугирования образца плевральной жидкости после его забора у субъекта и ресуспендирования центрифугата или осадка в буфере. В некоторых вариантах осуществления образец плевральной жидкости подвергают многократному центрифугированию и ресуспендированию до криоконсервации для транспортировки или последующего анализа и/или обработки.

В некоторых вариантах осуществления образцы плевральной жидкости концентрируют перед дальнейшими этапами обработки с помощью способа фильтрации. В некоторых вариантах осуществления образец плевральной жидкости, применяемый на этапе контактирования, готовят путем фильтрации жидкости через фильтр, содержащий поры известного и по существу одинакового размера, который позволяет проходить плевральной жидкости через мембрану, но удерживает опухолевые клетки. В некоторых вариантах осуществления диаметр пор мембраны может составлять по меньшей мере 4 мкм. В другом варианте осуществления диаметр пор может составлять 5 мкм или более, а в другом варианте осуществления любой из 6, 7, 8, 9 или 10 мкМ. После фильтрации клетки, включая TIL, удерживаемые мембраной, можно смыть с мембраны в подходящий физиологически приемлемый буфер. Клетки, включая TIL, концентрированные таким образом, затем можно применять на стадии контактирования в способе.

В некоторых вариантах осуществления образец плевральной жидкости (включая, например, необработанную плевральную жидкость), разбавленную плевральную жидкость или ресуспендированный клеточный осадок контактируют с литическим реагентом, который выборочно лизирует безъядерные красные кровяные клетки, присутствующие в образце. В некоторых вариантах осуществления этот этап выполняют до дальнейших этапов обработки в условиях, когда плевральная жидкость содержит значительное количество красных кровяных клеток (RBC). Подходящие лизирующие реагенты включают один литический реагент или литический реагент и реагент гашения, или литический реагент, реагент гашения и реагент фиксации. Подходящие литические системы имеются в продаже и включают систему BD Pharm Lyse™ (Becton Dickenson). Другие литические системы включают систему Versalyse™, систему FACSlyse™ (Becton Dickenson), систему Immunoprep™ или систему Erythrolyse II (Beckman Coulter, Inc.) или систему хлорида аммония. В некоторых вариантах осуществления литический реагент может варьироваться, при этом основными требованиями являются эффективный лизис красных кровяных клеток и сохранение TIL и фенотипических свойств TIL в плевральной жидкости. Помимо применения одного реагента для лизиса, литические системы, применимые в способах, описанных в настоящем документе, могут включать второй реагент, например, такой, который гасит или замедляет действие литического реагента на остальных этапах способа, например, реагент Stabilyse™. (Beckman Coulter, Inc.). Также можно применять обычный фиксирующий реагент в зависимости от выбора литических реагентов или предпочтительной реализации способа.

В некоторых вариантах осуществления образец плевральной жидкости, необработанный, разбавленный или многократно центрифугированный или обработанный, как описано в настоящем документе выше, подвергают криоконсервации при температуре около -140°C до дальнейшей обработки и/или размножения, как предусмотрено в настоящем документе.

B. Этап B. Первое размножение.

1. Молодые TIL.

В некоторых вариантах осуществления настоящие способы обеспечивают получение молодых TIL, которые способны к увеличению циклов репликации при введении субъекту/пациенту и, как таковые, могут обеспечивать дополнительные терапевтические преимущества в сравнении с более старыми TIL (т.е. TIL, которые в дальнейшем подверглись большему количеству циклов репликации до введения субъекту/пациенту). Признаки молодых TIL были описаны в литературе, например, Donia, at al., Scandinavian Journal of Immunology, 75:157-167 (2012); Dudley et al., Clin Cancer Res, 16:6122-6131 (2010); Huang et al., J Immunother, 28(3):258-267 (2005); Besser et al., Clin Cancer Res, 19(17):OF1-OF9 (2013); Besser et al., J Immunother 32:415-423 (2009); Robbins, et al., J Immunol 2004; 173:7125-7130; Shen et al., J Immunother, 30:123-129 (2007); Zhou, et al., J Immunother, 28:53-62 (2005); and Tran, et al., J Immunother, 31:742-751 (2008), все из которых полностью включены в настоящий документ посредством ссылки.

Разнообразные антигенные рецепторы T- и B-лимфоцитов образуются в результате соматической рекомбинации ограниченного, но большого числа генных сегментов. Указанные генные сегменты включают: V (вариабельность), D (разнообразие), J (присоединение) и C (константа) определяют специфич-

ность связывания и последующие применения иммуноглобулинов и Т-клеточных рецепторов (TCR). Настоящее изобретение обеспечивает способ создания TIL, которые демонстрируют и увеличивают разнообразие репертуара Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления TIL, полученные настоящим способом, демонстрируют увеличение разнообразия репертуара Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления TIL, полученные настоящим способом, демонстрируют увеличение разнообразия репертуара Т-клеток в сравнении со свежесобранными TIL и/или TIL, полученными способами, отличными от описанных в настоящем документе, включая, например, способы, отличные от представленных на фиг. 9. В некоторых вариантах осуществления TIL, полученные настоящим способом, демонстрируют увеличение разнообразия репертуара Т-клеток в сравнении со свежесобранными TIL и/или TIL, полученными способами, называемыми процессом 1C, как представлено на фиг. 10. В некоторых вариантах осуществления TIL, 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 присутствует в тяжелой цепи иммуноглобулина. В некоторых вариантах осуществления разнообразие иммуноглобулина присутствует в легкой цепи иммуноглобулина. В некоторых вариантах осуществления разнообразие присутствует 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. TCRα/β).

После рассечения или расщепления фрагментов опухоли, например, как описано на этапе A на фиг. 9, полученные клетки культивируют в сыворотке, содержащей IL-2, в условиях, которые благоприятствуют росту TIL над опухолевыми и другими клетками. В некоторых вариантах осуществления расщепления опухоли инкубируют в лунках объемом 2 мл в среде, содержащей инактивированную сыворотку AB человека с 6000 МЕ/мл IL-2. Эту популяцию первичных клеток культивируют в течение нескольких дней, обычно от 3 до 14 дней, в результате чего получается популяция суммарных TIL, обычно около 1×10^8 суммарных TIL. В некоторых вариантах осуществления эту популяцию первичных клеток культивируют в течение периода от 7 до 14 дней, в результате чего получается популяция суммарных TIL, обычно около 1×10^8 суммарных TIL. В некоторых вариантах осуществления эту популяцию первичных клеток культивируют в течение периода от 10 до 14 дней, в результате чего получается популяция суммарных TIL, обычно около 1×10^8 суммарных TIL. В некоторых вариантах осуществления эту популяцию первичных клеток культивируют в течение около 11 дней, в результате чего получается популяция суммарных TIL, обычно около 1×10^8 суммарных TIL.

В предпочтительном варианте осуществления размножение TIL может быть выполнено с помощью начального этапа размножения суммарных TIL (например, описанных на этапе B на фиг. 9, который может включать процессы, называемые pre-REP), как описано ниже и в настоящем документе, с последующим вторым размножением (этап D, включая процессы, называемые этапами протокола быстрого размножения (REP)), как описано ниже в разделе "Этап D" и в настоящем документе, с последующей необязательной криоконсервацией и последующим вторым этапом D (включая процессы, называемые этапами повторной стимуляции REP), как описано ниже и в настоящем документе. TIL, полученные в результате этого процесса, могут быть необязательно охарактеризованы по фенотипическим характеристикам и метаболическим параметрам, как описано в настоящем документе.

В вариантах осуществления, в которых культуры TIL инициируют в 24-луночных планшетах, например, с помощью 24-луночного кластера для клеточных культур Costar с плоским дном (Corning Incorporated, Корнинг, штат Нью-Йорк), в каждую лунку можно засевать 1×10^6 клеток расщепленной опухоли или один фрагмент опухоли в 2 мл полной среды (CM) с IL-2 (6000 МЕ/мл; Chiron Corp., Эмеривилл, штат Калифорния). В некоторых вариантах осуществления фрагмент опухоли составляет от около 1 $мм^3$ до 10 $мм^3$.

В некоторых вариантах осуществления первая культуральная среда для размножения называется "CM", что является аббревиатурой для культуральной среды. В некоторых вариантах осуществления CM для этапа B состоит из RPMI 1640 с GlutaMAX, дополненного 10% сывороткой AB человека, 25 мМ HEPES и 10 мг/мл гентамицина. В вариантах осуществления, в которых культуры инициируют в газопроницаемых колбах емкостью 40 мл с газопроницаемым силиконовым дном площадью 10 $см^2$ (например, G-Rex10; Wilson Wolf Manufacturing, Нью-Брайтон, штат Миннесота) (фиг. 1), в каждую колбу загружали $10\text{-}40\times10^6$ жизнеспособных клеток расщепленной опухоли или 5-30 фрагментов опухоли в 10-40 мл CM с IL-2 Как G-Rex10, так и 24-луночные планшеты инкубировали во влажном инкубаторе при 37°C в среде с 5% CO_2 и через 5 дней после начала культивирования половину среды удаляли и заменяли свежей CM и IL-2, а через 5 дней, половину среды меняли каждые 2-3 дня.

После подготовки фрагментов опухоли полученные клетки (т.е. фрагменты) культивируют в сыворотке, содержащей IL-2, в условиях, благоприятствующих росту TIL над опухолевыми и другими клетками. В некоторых вариантах осуществления расщепления опухоли инкубируют в лунках объемом 2 мл в среде, содержащей инактивированную сыворотку AB человека (или, в некоторых случаях, как описано в настоящем документе, в присутствии популяции клеток aAPC) с 6000 МЕ/мл IL-2. Эту популяцию первичных клеток культивируют в течение нескольких дней, обычно от 10 до 14 дней, в результате чего получается популяция суммарных TIL, обычно около 1×10^8 суммарных TIL. В некоторых вариантах осуществления питательная среда 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 удельную активность $20\text{-}30\times10^6$ МЕ/мг на 1 мг флакон. В некоторых вариантах осуществления исходный раствор IL-2 имеет удельную активность 20×10^6 МЕ/мг на 1 мг флакон. В некоторых вариантах осуществления исходный раствор IL-2 имеет удельную активность 25×10^6 МЕ/мг на 1 мг флакон. В некоторых вариантах осуществления исходный раствор IL-2 имеет удельную активность 30×10^6 МЕ/мг на 1 мг флакон. В некоторых вариантах осуществления исходный раствор IL-2 имеет конечную концентрацию $4\text{-}8\times10^6$ МЕ/мг IL-2. В некоторых вариантах осуществления исходный раствор IL-2 имеет конечную концентрацию $5\text{-}7\times10^6$ МЕ/мг IL-2. В некоторых вариантах осуществления исходный раствор IL-2 имеет конечную концентрацию 6×10^6 МЕ/мг IL-2. В некоторых вариантах осуществления исходный раствор IL-2 готовят, как описано в примере 4. В некоторых вариантах осуществления первая культуральная среда для размножения содержит около 10000 МЕ/мл IL-2, около 9000 МЕ/мл IL-2, около 8000 МЕ/мл IL-2, около 7000 МЕ/мл IL-2, около 6000 МЕ/мл IL-2 или около 5000 МЕ/мл IL-2. В некоторых вариантах осуществления первая культуральная среда для размножения содержит от около 9000 МЕ/мл IL-2 до около 5000 МЕ/мл IL-2. В некоторых вариантах осуществления первая культуральная среда для размножения содержит от около 8000 МЕ/мл IL-2 до около 6000 МЕ/мл IL-2. В некоторых вариантах осуществления первая культуральная среда для размножения содержит от около 7000 МЕ/мл IL-2 до около 6000 МЕ/мл IL-2. В некоторых вариантах осуществления первая культуральная среда для размножения содержит около 6000 МЕ/мл IL-2. В одном варианте осуществления культуральная среда для клеток дополнительно содержит IL-2. В некоторых вариантах осуществления культуральная среда для клеток содержит около 3000 МЕ/мл IL-2. В одном варианте осуществления культуральная среда для клеток дополнительно содержит IL-2. В предпочтительном варианте осуществления культуральная среда для клеток содержит около 3000 МЕ/мл IL-2. В одном варианте осуществления культуральная среда для клеток содержит около 1000 МЕ/мл, около 1500 МЕ/мл, около 2000 МЕ/мл, около 2500 МЕ/мл, около 3000 МЕ/мл, около 3500 МЕ/мл, около 4000 МЕ/мл., около 4500 МЕ/мл, около 5000 МЕ/мл, около 5500 МЕ/мл, около 6000 МЕ/мл, около 6500 МЕ/мл, около 7000 МЕ/мл, около 7500 МЕ/мл или около 8000 МЕ/мл IL-2. В одном варианте осуществления культуральная среда для клеток содержит от 1000 до 2000 МЕ/мл, от 2000 до 3000 МЕ/мл, от 3000 до 4000 МЕ/мл, от 4000 до 5000 МЕ/мл, от 5000 до 6000 МЕ/мл, от 6000 до 7000 МЕ/мл, от 7000 до 8000 МЕ/мл или около 8000 МЕ/мл IL-2.

В некоторых вариантах осуществления первая культуральная среда для размножения содержит около 500 МЕ/мл IL-15, около 400 МЕ/мл IL-15, около 300 МЕ/мл IL-15, около 200 МЕ/мл IL-15, около 180 МЕ/мл IL-15, около 160 МЕ/мл IL-15, около 140 МЕ/мл IL-15, около 120 МЕ/мл IL-15 или около 100 МЕ/мл IL-15. В некоторых вариантах осуществления первая культуральная среда для размножения содержит от около 500 МЕ/мл IL-15 до около 100 МЕ/мл IL-15. В некоторых вариантах осуществления первая культуральная среда для размножения содержит от около 400 МЕ/мл IL-15 до около 100 МЕ/мл IL-15. В некоторых вариантах осуществления первая культуральная среда для размножения содержит от около 300 МЕ/мл IL-15 до около 100 МЕ/мл IL-15. В некоторых вариантах осуществления первая культуральная среда для размножения содержит около 200 МЕ/мл IL-15. В некоторых вариантах осуществления культуральная среда для клеток содержит около 180 МЕ/мл IL-15. В одном варианте осуществления культуральная среда для клеток дополнительно содержит IL-15. В предпочтительном варианте осуществления культуральная среда для клеток содержит около 180 МЕ/мл IL-15.

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

да для клеток содержит около 1 МЕ/мл IL-21. В некоторых вариантах осуществления культуральная среда для клеток содержит около 0,5 МЕ/мл IL-21. В одном варианте осуществления культуральная среда для клеток дополнительно содержит IL-21. В предпочтительном варианте осуществления культуральная среда для клеток содержит около 1 МЕ/мл IL-21.

В одном варианте осуществления культуральная среда для клеток содержит антитело OKT-3. В некоторых вариантах осуществления культуральная среда для клеток содержит около 30 нг/мл антитела OKT-3. В одном варианте осуществления культуральная среда для клеток содержит около 0,1 нг/мл, около 0,5 нг/мл, около 1 нг/мл, около 2,5 нг/мл, около 5 нг/мл, около 7,5 нг/мл, около 10 нг/мл, около 15 нг/мл, около 20 нг/мл, около 25 нг/мл, около 30 нг/мл, около 35 нг/мл, около 40 нг/мл, около 50 нг/мл, около 60 нг/мл, около 70 нг/мл, около 80 нг/мл, около 90 нг/мл, около 100 нг/мл, около 200 нг/мл, около 500 нг/мл и около 1 мкг/мл антитела OKT-3. В одном варианте осуществления культуральная среда для 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 и 30 нг/мл, от 30 нг/мл до 40 нг/мл, от 40 нг/мл до 50 нг/мл и от 50 нг/мл до 100 нг/мл антитела OKT-3. В некоторых вариантах осуществления культуральная среда для клеток не содержит антитела OKT-3. В некоторых вариантах осуществления антитело OKT-3 представляет собой муромонаб.

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

В некоторых вариантах осуществления в дополнение к одному или более агонистам TNFRSF культуральная среда для клеток дополнительно содержит IL-2 в начальной концентрации около 3000 МЕ/мл и антитело OKT-3 в начальной концентрации около 30 нг/мл, причем один или более агонистов TNFRSF включают агонист 4-1BB.

В некоторых вариантах осуществления первая культуральная среда для размножения называется "CM", что является аббревиатурой для культуральной среды. В некоторых вариантах осуществления она называется CM1 (культуральная среда 1). В некоторых вариантах осуществления CM состоит из RPMI 640 с GlutaMAX, дополненного 10% сывороткой AB человека, 25 мМ HEPES и 10 мг/мл гентамицина. В вариантах осуществления, в которых культуры инициируют в газопроницаемых колбах емкостью 40 мл с газопроницаемым силиконовым дном площадью 10 $см^2$ (например, G-Rex10; Wilson Wolf Manufacturing, Нью-Брайтон, штат Миннесота) (фиг. 1), в каждую колбу загружали $10\text{-}40\times10^6$ жизнеспособных клеток расщепленной опухоли или 5-30 фрагментов опухоли в 10-40 мл CM с IL-2 Как G-Rex10, так и 24-луночные планшеты инкубировали во влажном инкубаторе при 37°C в среде с 5% CO_2 и через 5 дней после начала культивирования половину среды удаляли и заменяли свежей CM и IL-2, а через 5 дней, половину среды меняли каждые 2-3 дня. В некоторых вариантах осуществления CM представляет собой CM1, описанный в примерах, см. пример 5. В некоторых вариантах осуществления первое размножение происходит в исходной культуральной среде для клеток или в первой культуральной среде для клеток. В некоторых вариантах осуществления исходная культуральная среда для клеток или первая культуральная среда для клеток содержит IL-2.

В некоторых вариантах осуществления первый процесс размножения (включая процессы, такие как, например, описанные на этапе B на фиг. 9, которые могут включать процессы, иногда называемые pre-REP) сокращается до 3-14 дней, как описано в примерах и на фигурах. В некоторых вариантах осуществления первое размножение (включая процессы, такие как, например, описанные на этапе B на фиг. 9, которые могут включать процессы, иногда называемые pre-REP) сокращается до 7-14 дней, как показано на фиг. 5, 6, 8, 9, 10 и 11, а также включая, например, размножение, как описано на этапе B на фиг. 9. В некоторых вариантах осуществления первое размножение на этапе B сокращается до 10-14 дней, как показано на фиг. 5, 6, 8, 9, 10 и 11. В некоторых вариантах осуществления первое размножение сокращается до 11 дней, как показано на фиг. 5, 6, 8, 9, 10 и 11, а также включает, например, размножение, как описано на этапе B на фиг. 9.

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

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

В некоторых вариантах осуществления комбинация IL-2, IL-7, IL-15 и/или IL-21 применяется в виде комбинации во время первого 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 первого размножения, включая, например, во время процессов этапа B согласно фиг. 9, а также как описано в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления комбинация IL-2, IL-15 и IL-21 применяется в виде комбинации во время первого размножения. В некоторых вариантах осуществления IL-2, IL-15 и IL-21, а также любые их комбинации могут быть включены во время процессов этапа B согласно фиг. 9 и как описано в настоящем документе.

В некоторых вариантах осуществления процесс первого размножения (включая процессы, называемые pre-REP; например, этап B согласно фиг. 9) сокращается до 3-14 дней, как показано на фигурах. В некоторых вариантах осуществления первое размножение на этапе B сокращается до 7-14 дней, как показано на фиг. 5, 6, 8, 9, 10 и 11. В некоторых вариантах осуществления первое размножение на этапе B сокращается до 10-14 дней, как показано на фиг. 5, 6, 8, 9, 10 и 11. В некоторых вариантах осуществления первое размножение сокращается до 11 дней, как показано на фиг. 5, 6, 8, 9, 10 и 11.

В некоторых вариантах осуществления первое размножение, например, этап B согласно фиг. 9, выполняют в биореакторе закрытой системы. В некоторых вариантах осуществления для размножения TIL применяют закрытую систему, как описано в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления применяют отдельный биореактор. В некоторых вариантах осуществления отдельным применяемым биореактором является, например, G-REX-10 или G-REX-100. В некоторых вариантах осуществления биореактор закрытой системы представляет собой отдельный биореактор.

1. Цитокины и другие добавки.

В описанных в настоящем документе способах размножения обычно применяют культуральные среды с высокими дозами цитокина, в частности IL-2, как известно в данной области техники.

Альтернативно, дополнительно возможно применение комбинаций цитокинов для быстрого размножения и/или второго размножения TIL с комбинациями двух или более IL-2, IL-15 и IL-21, как описано в публикации заявки на патент США № US 2017/0107490 A1, описание которой включено 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 или IL-15 и IL-21, причем последняя находит особое применение во многих вариантах осуществления. Применение комбинаций цитокинов специфически способствует образованию лимфоцитов и, в частности, Т-клеток, как описано в настоящем документе.

В одном варианте осуществления этап B может также включать добавление антитела OKT-3 или муромонаба к культуральной среде, как описано в другом месте настоящего документа. В одном варианте осуществления этап B может также включать добавление агониста 4-1BB к культуральной среде, как описано в другом месте настоящего документа. В одном варианте осуществления этап B может также включать добавление агониста OX-40 к культуральной среде, как описано в другом месте настоящего документа. В других вариантах осуществления добавки, такие как агонисты коактиватора 1-альфа гамма-рецептора, активируемого пролифератором пероксисом, включая агонисты гамма-рецептора, активируемого пролифератором (PPAR), такие как соединение тиазолидиндиона, могут быть применены в культуральной среде во время этапа B, как описано в публикации заявки на патент США № US 2019/0307796 A1, описание которой включено в настоящий документ посредством ссылки.

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

В некоторых случаях популяцию суммарных TIL, полученную в результате первого размножения, включая, например, популяцию TIL, полученную, например, на этапе B, как показано на фиг. 9, можно

немедленно подвергнуть криоконсервации с помощью протоколов, описанных ниже в настоящем документе. Альтернативно, популяция TIL, полученная в результате первого размножения, называемая второй популяцией TIL, может быть подвергнута второму размножению (которое может включать размножения, иногда называемые REP), а затем подвергнута криоконсервации, как описано ниже. Аналогичным образом, в случае, когда генетически модифицированные TIL будут применяться в терапии, первая популяция TIL (иногда называемая популяцией суммарных TIL) или вторая популяция TIL (которая может в некоторых вариантах осуществления включать популяции, называемые популяциями REP TIL) могут быть подвергнуты генетическим модификациям для подходящей обработки до размножения или после первого размножения и до второго размножения.

В некоторых вариантах осуществления TIL, полученные в результате первого размножения (например, на этапе B, как показано на фиг. 9), сохраняются до фенотипирования для селекции. В некоторых вариантах осуществления TIL, полученные в результате первого размножения (например, на этапе B, как показано на фиг. 9), не сохраняются и переходят непосредственно ко второму размножению. В некоторых вариантах осуществления TIL, полученные в результате первого размножения, не подвергают криоконсервации после первого размножения и до второго размножения. В некоторых вариантах осуществления переход от первого размножению ко второму размножению происходит через около 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 того, как происходит фрагментация. В некоторых вариантах осуществления переход от первого размножения ко второму размножению происходит через около 3-14 дней, после того как происходит фрагментация. В некоторых вариантах осуществления переход от первого размножения ко второму размножению происходит через около 4-14 дней после того, как происходит фрагментация. В некоторых вариантах осуществления переход от первого размножения ко второму размножению происходит через около 4-10 дней, после того как происходит фрагментация. В некоторых вариантах осуществления переход от первого размножения ко второму размножению происходит через около 7-14 дней, после того как происходит фрагментация. В некоторых вариантах осуществления переход от первого размножения ко второму размножению происходит через около 14 дней, после того как происходит фрагментация.

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 того, как происходит фрагментация. В некоторых вариантах осуществления переход от первого размножения ко второму размножению происходит через 1-14 дней после того, как происходит фрагментация. В некоторых вариантах осуществления первое размножение TIL может продолжаться от 2 до 14 дней. В некоторых вариантах осуществления переход от первого размножения ко второму размножению происходит через 3-14 дней после того, как происходит фрагментация. В некоторых вариантах осуществления переход от первого размножения ко второму размножению происходит через 4-14 дней после того, как происходит фрагментация. В некоторых вариантах осуществления переход от первого размножения ко второму размножению происходит через 5-14 дней после того, как происходит фрагментация. В некоторых вариантах осуществления переход от первого размножения ко второму размножению происходит через 6-14 дней после того, как происходит фрагментация. В некоторых вариантах осуществления переход от первого размножения ко второму размножению происходит через 7-14 дней после того, как происходит фрагментация. В некоторых вариантах осуществления переход от первого размножения ко второму размножению происходит через 8-14 дней после того, как происходит фрагментация. В некоторых вариантах осуществления переход от первого размножения ко второму размножению происходит через 9-14 дней после того, как происходит фрагментация. В некоторых вариантах осуществления переход от первого размножения ко второму размножению происходит через 10-14 дней после того, как происходит фрагментация. В некоторых вариантах осуществления переход от первого размножения ко второму размножению происходит через 11-14 дней после того, как происходит фрагментация. В некоторых вариантах осуществления переход от первого размножения ко второму размножению происходит через 12-14 дней после того, как происходит фрагментация. В некоторых вариантах осуществления переход от первого размножения ко второму размножению происходит через 13-14 дней после того, как происходит фрагментация. В некоторых вариантах осуществления переход от первого размножения ко второму размножению происходит через 14 дней после того, как происходит фрагментация. В некоторых вариантах осуществления переход от первого размножения ко второму размножению происходит через 1-11 дней после того, как происходит фрагментация. В некоторых вариантах осуществления переход от первого размножения ко второму размножению происходит через 2-11 дней после того, как происходит фрагментация. В некоторых вариантах осуществления переход от первого размножения ко второму размножению происходит через 3-11 дней после того, как происходит фрагментация. В некоторых вариантах осуществления переход от первого размножения ко второму размножению происходит через 4-11 дней после того, как происходит фрагментация. В некоторых вариантах осуществления переход от первого размножения ко второму размножению происходит через 5-11 дней после того, как происходит фрагментация. В некоторых вариантах осуществления переход от первого размножения ко второму размножению происходит через 6-11 дней после того, как происходит фрагментация. В некоторых вариантах осуществления переход от первого размножения ко второму размножению про-

исходит через 7-11 дней после того, как происходит фрагментация. В некоторых вариантах осуществления переход от первого размножения ко второму размножению происходит через 8-11 дней после того, как происходит фрагментация. В некоторых вариантах осуществления переход от первого размножения ко второму размножению происходит через 9-11 дней после того, как происходит фрагментация. В некоторых вариантах осуществления переход от первого размножения ко второму размножению происходит через 10-11 дней после того, как происходит фрагментация. В некоторых вариантах осуществления переход от первого размножения ко второму размножению происходит через 11 дней после того, как происходит фрагментация.

В некоторых вариантах осуществления TIL не сохраняются после первого размножения и до второго размножения, а TIL переходят непосредственно ко второму размножению (например, в некоторых вариантах осуществления при переходе от этапа B к этапу D нет сохранения как показано на фиг. 9). В некоторых вариантах осуществления переход происходит в закрытой системе, как описано в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления TIL из первого размножения, второй популяции TIL, переходят непосредственно ко второму размножению без переходного периода.

В некоторых вариантах осуществления переход от первого размножения ко второму размножению, например, этап C согласно фиг. 9, выполняют в биореакторе закрытой системы. В некоторых вариантах осуществления для размножения TIL применяют закрытую систему, как описано в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления применяют отдельный биореактор. В некоторых вариантах осуществления отдельным применяемым биореактором является, например, G-REX-10 или G-REX-100. В некоторых вариантах осуществления биореактор закрытой системы представляет собой отдельный биореактор.

D. Этап D. Второе размножение.

В некоторых вариантах осуществления популяция клеток TIL размножается после сбора и первоначальной суммарной обработки, например, после этапа A и этапа B, и перехода, называемого этапом C, как показано на фиг. 9. Это дополнительное размножение упоминается в настоящем документе как второе размножение, которое может включать процессы размножения, обычно называемые в данной области техники процессом быстрого размножения (REP, а также процессы, указанные на этапе D на фиг. 9). Второе размножение обычно осуществляют с помощью культуральной среды, содержащей ряд компонентов, включая питающие клетки, источник цитокинов и антитело к CD3, в газопроницаемом контейнере.

В некоторых вариантах осуществления второе размножение или второе размножение TIL (которое может включать размножения, иногда называемые REP, а также процессы, указанные на этапе D на фиг. 9) может быть выполнено с помощью любых колб или контейнеров для TIL, известных специалистам в данной области техники. В некоторых вариантах осуществления второе размножение TIL 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 TIL может продолжаться от около 7 дней до около 14 дней. В некоторых вариантах осуществления второе размножение TIL может продолжаться от около 8 до около 14 дней. В некоторых вариантах осуществления второе размножение TIL может продолжаться от около 9 до около 14 дней. В некоторых вариантах осуществления второе размножение TIL может продолжаться от около 10 дней до около 14 дней. В некоторых вариантах осуществления второе размножение TIL может продолжаться от около 11 до около 14 дней. В некоторых вариантах осуществления второе размножение TIL может продолжаться от около 12 до около 14 дней. В некоторых вариантах осуществления второе размножение TIL может продолжаться от около 13 до около 14 дней. В некоторых вариантах осуществления второе размножение TIL может продолжаться в течение около 14 дней.

В одном варианте осуществления второе размножение может быть выполнено в газопроницаемом контейнере способами по настоящему изобретению (включая, например, размножения, называемые REP, а также процессы, указанные на этапе D фиг. 9). Например, TIL можно быстро размножить с помощью неспецифической стимуляции рецептора Т-клеток в присутствии интерлейкина-2 (IL-2) или интерлейкина-15 (IL-15). Стимул неспецифического рецептора Т-клеток может включать, например, антитело к CD3, такое как примерно 30 нг/мл OKT3, мышиное моноклональное антитело к CD3 (коммерчески доступное от компании Ortho-McNeil, Раритан, штат Нью-Джерси или компании Miltenyi Biotech, Оберн, штат Калифорния) или UHCT-1 (коммерчески доступный от компании BioLegend, Сан-Диего, штат Калифорния, США). TIL можно размножать, чтобы вызывать дополнительную стимуляцию TIL in vitro, путем включения одного или более антигенов во время второго размножения, включая их антигенные части, такие как эпитоп(ы) рака, которые могут быть необязательно экспрессированы из вектора, такого как пептид, связывающий человеческий лейкоцитарный антиген A2 (HLA-A2), например, 0,3 мкМ MART-1:26-35 (27 L) или gpl 00:209-217 (210M), необязательно в присутствии фактора роста Т-клеток, 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 тирозиназы, MAGE-A3, SSX-2 и VEGFR2 или их антигенные части. TIL также могут быть быстро размножены с помощью повторной стимуляции тем же антигеном (антигенами) рака, который введен в экспрессирующие HLA-A2 антигенпрезентирующие клетки. Альтернативно, TIL можно дополнительно повторно стимулировать, например, облученными аутологичными лимфо-

цитами или облученными аллогеиными лимфоцитами HLA-A2+ и IL-2. В некоторых вариантах осуществления повторная стимуляция происходит в рамках 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 культуральная среда для клеток дополнительно содержит IL-2. В некоторых вариантах осуществления культуральная среда для клеток содержит около 3000 МЕ/мл IL-2. В одном варианте осуществления культуральная среда для клеток содержит около 1000 МЕ/мл, около 1500 МЕ/мл, около 2000 МЕ/мл, около 2500 МЕ/мл, около 3000 МЕ/мл, около 3500 МЕ/мл, около 4000 МЕ/мл, около 4500 МЕ/мл, около 5000 МЕ/мл, около 5500 МЕ/мл, около 6000 МЕ/мл, около 6500 МЕ/мл, около 7000 МЕ/мл, около 7500 МЕ/мл или около 8000 МЕ/мл IL-2. В одном варианте осуществления культуральная среда для клеток содержит от 1000 до 2000 МЕ/мл, от 2000 до 3000 МЕ/мл, от 3000 до 4000 МЕ/мл, от 4000 до 5000 МЕ/мл, от 5000 до 6000 МЕ/мл, от 6000 до 7000 МЕ/мл, от 7000 до 8000 МЕ/мл или около 8000 МЕ/мл IL-2.

В одном варианте осуществления культуральная среда для клеток содержит антитело OKT3. В некоторых вариантах осуществления культуральная среда для клеток содержит около 30 нг/мл антитела OKT3. В одном варианте осуществления культуральная среда для клеток содержит около 0,1 нг/мл, около 0,5 нг/мл, около 1 нг/мл, около 2,5 нг/мл, около 5 нг/мл, около 7,5 нг/мл, около 10 нг/мл, около 15 нг/мл, около 20 нг/мл, около 25 нг/мл, около 30 нг/мл, около 35 нг/мл, около 40 нг/мл, около 50 нг/мл, около 60 нг/мл, около 70 нг/мл, около 80 нг/мл, около 90 нг/мл, около 100 нг/мл, около 200 нг/мл, около 500 нг/мл и около 1 мкг/мл антитела OKT3. В одном варианте осуществления культуральная среда для 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 и 30 нг/мл, от 30 нг/мл до 40 нг/мл, от 40 нг/мл до 50 нг/мл и от 50 нг/мл до 100 нг/мл антитела OKT3.

В некоторых вариантах осуществления комбинация IL-2, IL-7, IL-15 и/или IL-21 применяется 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, включая, например, во время процессов этапа D согласно фиг. 9, а также как описано в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления комбинация IL-2, IL-15 и IL-21 применяется в виде комбинации во время второго размножения. В некоторых вариантах осуществления IL-2, IL-15 и IL-21, а также любые их комбинации могут быть включены во время процессов этапа D согласно фиг. 9 и как описано в настоящем документе.

В некоторых вариантах осуществления второе размножение можно проводить в культруальной среде для клеток с добавками, содержащей IL-2, OKT-3 и антигенпрезентирующие питающие клетки. В некоторых вариантах осуществления второе размножение происходит в культуральной среде для клеток с добавками. В некоторых вариантах осуществления культуральная среда для клеток с добавками содержит IL-2, OKT-3 и антигенпрезентирующие питающие клетки. В некоторых вариантах осуществления вторая культуральная среда для клеток содержит IL-2, OKT-3 и антигенпрезентирующие клетки (APC; также называемые антигенпрезентирующими питающими клетками). В некоторых вариантах осуществления второе размножение происходит в культуральной среде для клеток, содержащей IL-2, OKT-3 и антигенпрезентирующие питающие клетки (т.е. антигенпрезентирующие клетки).

В некоторых вариантах осуществления вторая культуральная среда для размножения содержит около 500 МЕ/мл IL-15, около 400 МЕ/мл IL-15, около 300 МЕ/мл IL-15, около 200 МЕ/мл IL-15, около 180 МЕ/мл IL-15, около 160 МЕ/мл IL-15, около 140 МЕ/мл IL-15, около 120 МЕ/мл IL-15 или около 100 МЕ/мл IL-15. В некоторых вариантах осуществления вторая культуральная среда для размножения содержит от около 500 МЕ/мл IL-15 до около 100 МЕ/мл IL-15. В некоторых вариантах осуществления вторая культуральная среда для размножения содержит от около 400 МЕ/мл IL-15 до около 100 МЕ/мл IL-15. В некоторых вариантах осуществления вторая культуральная среда для размножения содержит от около 300 МЕ/мл IL-15 до около 100 МЕ/мл IL-15. В некоторых вариантах осуществления вторая культуральная среда для размножения содержит около 200 МЕ/мл IL-15. В некоторых вариантах осуществления культуральная среда для клеток содержит около 180 МЕ/мл IL-15. В одном варианте осуществления культуральная среда для клеток дополнительно содержит IL-15. В предпочтительном варианте осуществления культуральная среда для клеток содержит около 180 МЕ/мл IL-15.

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

IL-21 до около 1 МЕ/мл IL-21. В некоторых вариантах осуществления вторая культуральная среда для размножения содержит около 2 МЕ/мл IL-21. В некоторых вариантах осуществления культуральная среда для клеток содержит около 1 МЕ/мл IL-21. В некоторых вариантах осуществления культуральная среда для клеток содержит около 0,5 МЕ/мл IL-21. В одном варианте осуществления культуральная среда для клеток дополнительно содержит IL-21. В предпочтительном варианте осуществления культуральная среда для клеток содержит около 1 МЕ/мл IL-21.

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

В одном варианте осуществления REP и/или второе размножение проводят в колбах с суммарными TIL, смешанными со 100- или 200-кратным избытком инактивированных питающих клеток, 30 мг/мл антитела OKT3 к CD3 и 3000 МЕ/мл IL-2 в 150 мл среды. Производится замена среды (обычно 2/3 замены среды посредством дыхания 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 описано в примерах и на фигурах. В некоторых вариантах осуществления второе размножение сокращается до 11 дней.

В одном варианте осуществления REP и/или второе размножение можно проводить с помощью колб T-175 и газопроницаемых мешков, как описано ранее (Tran, et al., J. Immunother. 2008, 31, 742-51; Dudley, et al., J. Immunother. 2003, 26, 332-42) или газопроницаемой посуды для культивирования (колбы G-Rex). В некоторых вариантах осуществления второе размножение (включая размножения, называемые быстрыми размножениями) проводят в колбах T-175, причем в каждую колбу T-175 можно добавить около 1×10^6 TIL, суспендированных в 150 мл среды. TIL можно культивировать в смеси 1:1 среды CM и AIM-V с добавлением 3000 МЕ/мл IL-2 и 30 нг/мл антитела к CD3. Колбы T-175 можно инкубировать при 37°C в 5% CO_2. Половину среды можно заменить в день 5 с помощью среды 50/50 с 3000 МЕ/мл IL-2. В некоторых вариантах осуществления в день 7 клетки из двух колб T-175 можно объединить в 3-литровом мешке и 300 мл AIM V с 5% сывороткой AB человека и 3000 МЕ/мл IL-2 добавляли к 300 мл суспензии TIL. Количество клеток в каждом мешке подсчитывали каждый день или два, и добавляли свежую среду, чтобы поддерживать количество клеток в пределах от 0,5 до $2,0\times10^6$ клеток/мл.

В одном варианте осуществления второе размножение (которое может включать размножения, называемые REP, а также размножения, указанные на этапе D на фиг. 9) может быть выполнено в газопроницаемых колбах емкостью 500 мл с газопроницаемым силиконовым дном площадью 100 $см^2$ (G -Rex 100, коммерчески доступный от компании Wilson Wolf Manufacturing Corporation, Нью-Брайтон, штат Миннесота, США), 5×10^6 или 10×10^6 TIL можно культивировать с PBMC в 400 мл среды 50/50, дополненной 5% сывороткой AB человека, 3000 МЕ/мл IL-2 и 30 нг/мл антитела к CD3 (OKT3). Колбы G-Rex 100 можно инкубировать при 37°C в 5% CO_2. В день 5 можно отобрать 250 мл супернатанта и поместить в центрифужные пробирки и центрифугировать при 1500 об/мин (491×g) в течение 10 мин. Осадок TIL можно ресуспендировать в 150 мл свежей среды с 5% сыворотки AB человека, 3000 МЕ/мл IL-2 и добавить обратно в исходные колбы G-Rex 100. Когда TIL серийно размножают в колбах G-Rex 100, в день 7 TIL в каждой колбе G-Rex 100 можно суспендировать в 300 мл среды, присутствующей в каждой колбе, а клеточную суспензию можно разделить на 3 аликвоты по 100 мл, которые можно применять для засевания 3 колб G-Rex 100. Затем в каждую колбу можно добавить 150 мл AIM-V с 5% сывороткой AB человека и 3000 МЕ/мл IL-2. Колбы G-Rex 100 можно инкубировать при 37°C в 5% CO_2 и через 4 дня в каждую колбу G-REX 100 можно добавить 150 мл AIM-V с 3000 МЕ/мл IL-2. Клетки можно собирать в день 14 культивирования.

В одном варианте осуществления второе размножение (включая размножения, называемые REP) проводят в колбах с суммарными TIL, смешанными со 100- или 200-кратным избытком инактивированных питающих клеток, 30 мг/мл антитела OKT3 к CD3 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 путем дыхания 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 этап, на котором TIL выбирают по более высокой реактивности опухоли. Можно применять любой метод селекции, известный в данной области техники. На-

пример, способы, описанные в публикации заявки на патент США № 2016/0010058 A1, описание которой включено в настоящий документ в качестве ссылки, могут применяться для выбора TIL по более высокой реактивности опухоли.

Необязательно анализ на жизнеспособность клеток может быть выполнен после второго размножения (включая размножения, называемые REP) с помощью стандартных анализов, известных в данной области техники. Например, для образца суммарных TIL можно проводить анализ с трипановым синим, который избирательно метит мертвые клетки и позволяет оценивать жизнеспособность. В некоторых вариантах осуществления образцы TIL можно подсчитывать и определять их жизнеспособность с помощью автоматического счетчика клеток Cellometer K2 (Nexcelom Bioscience, Лоренс, штат Массачусетс). В некоторых вариантах осуществления жизнеспособность определяют в соответствии с протоколом автоматического счетчика клеток Cellometer K2 Image Cytometer, описанным, например, в примере 15.

В некоторых вариантах осуществления второе размножение (включая размножения, называемые REP) TIL может быть выполнено с помощью колб T-175 и газопроницаемых мешков, как описано ранее (Tran K.Q., Zhou J., Durflinger K.H., et al., 2008, J Immunother., 31:742-751, и 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 помощью колб. В некоторых вариантах осуществления второе размножение проводят с помощью газопроницаемых колб G-Rex. В некоторых вариантах осуществления второе размножение проводят в колбах T-175, при этом около 1×10^6 TIL суспендируют примерно в 150 мл среды и добавляют в каждую колбу T-175. TIL культивируют с облученными (50 Гр) аллогенными PBMC в качестве "питающих" клеток в соотношении 1:100, причем клетки культивировали в смеси 1:1 среды CM и AIM-V (среда 50/50), дополненной 3000 МЕ/мл IL-2 и 30 нг/мл антитела к CD3. Колбы T-175 инкубируют при 37°C в 5% CO_2. В некоторых вариантах осуществления половину среды заменяют в день 5 с помощью среды 50/50 с 3000 МЕ/мл IL-2. В некоторых вариантах осуществления в день 7 клетки из 2 колб T-175 объединяют в 3-литровом мешке и 300 мл AIM-V с 5% сывороткой AB человека и 3000 МЕ/мл IL-2 добавляют к 300 мл суспензии TIL. Количество клеток в каждом мешке можно подсчитывать каждый день или два, и можно добавлять свежую среду, чтобы поддерживать количество клеток в пределах от около 0,5 до около $2,0\times10^6$ клеток/мл.

В некоторых вариантах осуществления второе размножение (включая размножение, называемые REP) проводят в колбах емкостью 500 мл с газопроницаемым силиконовым дном площадью 100 $см^2$ (G-Rex 100, Wilson Wolf) (фиг. 1), приблизительно 5×10^6 или 10×10^6 TIL культивируют с облученными аллогенными PBMC в соотношении 1:100 в 400 мл среды 50/50, дополненной 3000 МЕ/мл IL-2 и 30 нг/мл антитела к CD3. Колбы G-Rex 100 инкубируют при 37°C в 5% CO_2. В некоторых вариантах осуществления в день 5 можно отобрать 250 мл супернатанта и поместить в центрифужные пробирки и центрифугировать при 1500 об/мин (491 g) в течение 10 мин. Затем осадок TIL можно ресуспендировать в 150 мл свежей среды 50/50 с 3000 МЕ/мл IL-2 и добавить обратно в исходные колбы G-Rex 100. В вариантах осуществления, в которых TIL серийно размножают в колбах G-Rex 100, на в день 7 TIL в каждой колбе G-Rex 100 суспендируют в 300 мл среды, присутствующей в каждой колбе, а клеточную суспензию делят на три аликвоты по 100 мл, которые применяют для засевания 3 колб G-Rex 100. Затем в каждую колбу добавляют 150 мл AIM-V с 5% сывороткой AB человека и 3000 МЕ/мл IL-2. Колбы G-Rex 100 инкубируют при 37°C в 5% CO_2 и через 4 дня в каждую колбу G-Rex 100 добавляют 150 мл AIM-V с 3000 МЕ/мл IL-2. Клетки собирают в день 14 культивирования.

Разнообразные антигенные рецепторы Т- и В-лимфоцитов образуются в результате соматической рекомбинации ограниченного, но большого числа генных сегментов. Указанные генные сегменты включают V (вариабельность), D (разнообразие), J (присоединение) и C (константа) определяют специфичность связывания и последующие применения иммуноглобулинов и Т-клеточных рецепторов (TCR). Настоящее изобретение обеспечивает способ создания TIL, которые демонстрируют и увеличивают разнообразие репертуара Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления TIL, полученные настоящим способом, демонстрируют увеличение разнообразия репертуара Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления TIL, полученные при 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 присутствует в тяжелой цепи иммуноглобулина. В некоторых вариантах осуществления разнообразие иммуноглобулина присутствует в легкой цепи иммуноглобулина. В некоторых вариантах осуществления разнообразие присутствует 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. TCRα/β).

В некоторых вариантах осуществления вторая культуральная среда для размножения (например,

иногда называемая CM2 или вторая культуральная среда для клеток) содержит IL-2, OKT-3, а также антигенпрезентирующие питающие клетки (APC), как описано в более подробно ниже.

В некоторых вариантах осуществления второе размножение, например, этап D согласно фиг. 9, выполняют в биореакторе закрытой системы. В некоторых вариантах осуществления для размножения TIL применяют закрытую систему, как описано в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления применяют отдельный биореактор. В некоторых вариантах осуществления отдельным применяемым биореактором является, например, G-REX-10 или G-REX-100. В некоторых вариантах осуществления биореактор закрытой системы представляет собой отдельный биореактор.

1. Питательные клетки и антигенпрезентирующие клетки.

В одном варианте осуществления вторые процедуры размножения, описанные в настоящем документе (например, включая размножение, такое как описанное на этапе D на фиг. 9, а также процедуры, называемые REP), требуют избытка питательных клеток во время размножения REP TIL и/или во время второго размножения. Во многих вариантах осуществления питательные клетки представляют собой мононуклеарные клетки периферической крови (PBMC), полученные из стандартных единиц цельной крови здоровых доноров крови. PBMC получают с помощью стандартных способов, таких как градиентное разделение Ficoll-Paque.

Как правило, аллогенные PBMC инактивируют путем облучения или термообработки и применяют в процедурах REP, как описано в примерах, в частности в примере 14, который предоставляет иллюстративный протокол для оценки неспособности к репликации облученных аллогенных PBMC.

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

В некоторых вариантах осуществления PBMC считаются неспособными к репликации и допускаются для применения в процедурах размножения TIL, описанных в настоящем документе, если общее количество жизнеспособных клеток, культивируемых в присутствии OKT3 и IL-2, в день 7 и день 14 не увеличилось в сравнении с начальным количеством жизнеспособных клеток, помещенных в культуру в день 0 REP и/или день 0 второго размножения (т.е. день начала второго размножения). В некоторых вариантах осуществления PBMC культивируют в присутствии 30 нг/мл антитела OKT3 и 3000 МЕ/мл IL-2, см., например, пример 13.

В некоторых вариантах осуществления PBMC считаются неспособными к репликации и допускаются для применения в процедурах размножения TIL, описанных в настоящем документе, если общее количество жизнеспособных клеток, культивируемых в присутствии OKT3 и IL-2, в день 7 и день 14 не увеличилось в сравнении с начальным количеством жизнеспособных клеток, помещенных в культуру в день 0 REP и/или день 0 второго размножения (т.е. день начала второго размножения). В некоторых вариантах осуществления PBMC культивируют в присутствии 5-60 нг/мл антитела OKT3 и 1000-6000 МЕ/мл IL-2. В некоторых вариантах осуществления PBMC культивируют в присутствии 10-50 нг/мл антитела OKT3 и 2000-5000 МЕ/мл IL-2. В некоторых вариантах осуществления PBMC культивируют в присутствии 20-40 нг/мл антитела OKT3 и 2000-4000 МЕ/мл IL-2. В некоторых вариантах осуществления PBMC культивируют в присутствии 25-35 нг/мл антитела OKT3 и 2500-3500 МЕ/мл IL-2.

В некоторых вариантах осуществления антигенпрезентирующие питающие клетки представляют собой PBMC. В некоторых вариантах осуществления антигенпрезентирующие питательные клетки представляют собой искусственные антигенпрезентирующие питательные клетки. В одном варианте осуществления отношение TIL к антигенпрезентирующим питательным клеткам при втором размножении составляет около 1:25, около 1:50, около 1:100, около 1:125, около 1:150, около 1:175, около 1:200, около 1:225, около 1:250, около 1:275, около 1:300, около 1:325, около 1:350, около 1:375, около 1:400 или около 1:500. В одном варианте осуществления отношение TIL к антигенпрезентирующим питательным клеткам при втором размножении составляет от 1:50 до 1:300. В одном варианте осуществления отношение TIL к антигенпрезентирующим питательным клеткам при втором размножении составляет от 1:100 до 1:200.

В одном варианте осуществления для описанных в настоящем документе процедур второго размножения требуется отношение около $2,5\times10^9$ питательных клеток к около 100×10^6 TIL. В другом варианте осуществления для описанных в настоящем документе процедур второго размножения требуется отношение около $2,5\times10^9$ питательных клеток к около 50×10^6 TIL. В еще одном варианте осуществления для описанных в настоящем документе процедур второго размножения требуется отношение около $2,5\times10^9$ питательных клеток к около 25×10^6 TIL.

В одном варианте осуществления для описанных в настоящем документе процедур второго размножения требуется избыток питательных клеток во время второго размножения. Во многих вариантах осуществления питательные клетки представляют собой мононуклеарные клетки периферической крови (PBMC), полученные из стандартных единиц цельной крови здоровых доноров крови. PBMC получают с

помощью стандартных способов, таких как градиентное разделение Ficoll-Paque. В одном варианте осуществления вместо PBMC применяют искусственные антигенпрезентирующие (aAPC) клетки.

Как правило, аллогенные PBMC инактивируют путем облучения или термической обработки и применяют в процедурах размножения TIL, описанных в настоящем документе, включая иллюстративные процедуры, описанные на фиг. 5, 6, 8, 9, 10 и 11.

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

2. Цитокины.

В описанных в настоящем документе способах размножения обычно применяют культуральные среды с высокими дозами цитокина, в частности IL-2, как известно в данной области техники.

Альтернативно, дополнительно возможно применение комбинаций цитокинов для быстрого размножения и/или второго размножения TIL с комбинациями двух или более IL-2, IL-15 и IL-21, как в целом описано в международной публикации № WO 2015/189356 и международной публикации W № WO 2015/189357, которые прямо включены в настоящий документ посредством ссылки во всей их полноте. 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 находит особое применение во многих вариантах осуществления. Применение комбинаций цитокинов специфически способствует образованию лимфоцитов и, в частности, Т-клеток, как описано в настоящем документе.

3. Антитела к CD3.

В некоторых вариантах осуществления культуральная среда, применяемая в способах размножения, описанных в настоящем документе (включая те, которые называются REP, см., например, фиг. 9), также включает антитело к CD3. Антитело к CD3 в сочетании с IL-2 вызывает активацию Т-клеток и деление клеток в популяции TIL. Этот эффект можно увидеть с полноразмерными антителами, а также с Fab- и $F(ab')_2$-фрагментами, при этом первые обычно предпочтительнее; см., например, Tsoukas et al., J. Immunol. 1985, 135, 1719, которая в полном объеме включена в настоящий документ посредством ссылки.

Как должно быть понятно специалистам в данной области техники, существует ряд подходящих антител к CD3 человека, которые находят применение в изобретении, включая поликлональные и моноклональные антитела к CD3 человека от различных млекопитающих, включая, помимо прочего, антитела мыши, человека, примата, крысы и собаки. В конкретных вариантах осуществления применяют антитело OKT3 к CD3 (коммерчески доступное от компании Ortho-McNeil, Раритан, штат Нью-Джерси или компании Miltenyi Biotech, Оберн, штат Калифорния).

E. Этап E. Сбор TIL.

После второго этапа размножения клетки могут быть собраны. В некоторых вариантах осуществления TIL собирают после одного, двух, трех, четырех или более этапов размножения, например, как показано на фиг. 9. В некоторых вариантах осуществления TIL собирают после двух этапов размножения, например, как показано на фиг. 9.

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

Сборщики клеток и/или системы обработки клеток коммерчески доступны из различных источников, включая, например, Fresenius Kabi, Tomtec Life Science, Perkin Elmer и Inotech Biosystems International, Inc. Любой сборщик клеток можно применять с настоящими способами. В некоторых вариантах осуществления сборщик клеток и/или системы обработки клеток представляют собой сборщик клеток на основе мембраны. В некоторых вариантах осуществления сбор клеток осуществляют с помощью системы обработки клеток, такой как система LOVO (производства Fresenius Kabi). Термин "система обработки клеток LOVO" также относится к любому инструменту или устройству, изготовленному любым поставщиком, которое может прокачивать раствор, содержащий клетки, через мембрану или фильтр, например, вращающуюся мембрану или вращающийся фильтр, в стерильной и/или закрытой среде системы, что позволяет при обработке клеток в режиме непрерывного потока удалять супернатант или культуральную среду для клеток без образования осадка. В некоторых вариантах осуществления сборщик клеток и/или система обработки клеток могут выполнять этапы разделения, промывки, обмена жидкостью, концентрирования и/или других операций обработки клеток в закрытой стерильной системе.

В некоторых вариантах осуществления сбор, например, этап E согласно фиг. 9, выполняют из биореактора закрытой системы. В некоторых вариантах осуществления для размножения TIL применяют закрытую систему, как описано в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления применяют отдельный биореактор. В некоторых вариантах осуществления отдельным применяемым биореактором является, например, G-REX-10 или G-REX-100. В некоторых вариантах осуществления биореактор закрытой системы представляет собой отдельный биореактор.

F. Этап F. Окончательный состав/перенос в инфузионный пакет.

После завершения этапов A-E, представленных в иллюстративном порядке на фиг. 9 и подробно

описанных выше и в настоящем документе, клетки переносят в контейнер для применения при введении пациенту. В некоторых вариантах осуществления после получения терапевтически достаточного количества TIL способами размножения, описанными выше, их переносят в контейнер для применения при введении пациенту.

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

1. Фармацевтические композиции, дозировки и режимы дозирования.

В одном варианте осуществления TIL, размноженные способами по настоящему изобретению, вводят пациенту в виде фармацевтической композиции. В одном варианте осуществления фармацевтическая композиция представляет собой суспензию TIL в стерильном буфере. TIL, размноженные с помощью PBMC по настоящему изобретению, можно вводить любым подходящим способом, известным в данной области техники. В некоторых вариантах осуществления Т-клетки вводят в виде однократной внутриартериальной или внутривенной инфузии, которая предпочтительно длится от приблизительно 30 до 60 мин. Другие подходящие пути введения включают внутрибрюшинное, подоболочечное и внутрилимфатическое введение.

Можно вводить любую подходящую дозу TIL. В некоторых вариантах осуществления вводят от около $2{,}3\times10^{10}$ до около $13{,}7\times10^{10}$ TIL, в среднем около $7{,}8\times10^{10}$ TIL, особенно если рак представляет собой меланому. В одном варианте осуществления вводят от около $1{,}2\times10^{10}$ до около $4{,}3\times10^{10}$ TIL. В некоторых вариантах осуществления вводят от около 3×10^{10} до около 12×10^{10} TIL. В некоторых вариантах осуществления вводят от около 4×10^{10} до около 10×10^{10} TIL. В некоторых вариантах осуществления вводят от около 5×10^{10} до около 8×10^{10} TIL. В некоторых вариантах осуществления вводят от около 6×10^{10} до около 8×10^{10} TIL. В некоторых вариантах осуществления вводят от около 7×10^{10} до около 8×10^{10} TIL. В некоторых вариантах осуществления терапевтически эффективная доза составляет от около $2{,}3\times10^{10}$ до около $13{,}7\times10^{10}$. В некоторых вариантах осуществления терапевтически эффективная доза составляет около $7{,}8\times10^{10}$ TIL, особенно если рак представляет собой меланому. В некоторых вариантах осуществления терапевтически эффективная доза составляет от около $1{,}2\times10^{10}$ до около $4{,}3\times10^{10}$ TIL. В некоторых вариантах осуществления терапевтически эффективная доза составляет от около 3×10^{10} до около 12×10^{10} TIL. В некоторых вариантах осуществления терапевтически эффективная доза составляет от около 4×10^{10} до около 10×10^{10} TIL. В некоторых вариантах осуществления терапевтически эффективная доза составляет от около 5×10^{10} до около 8×10^{10} TIL. В некоторых вариантах осуществления терапевтически эффективная доза составляет от около 6×10^{10} до около 8×10^{10} TIL. В некоторых вариантах осуществления терапевтически эффективная доза составляет от около 7×10^{10} до около 8×10^{10} TIL.

В некоторых вариантах осуществления количество TIL, предоставленных в фармацевтических композициях по настоящему изобретению, составляет около 1×10^{6}, 2×10^{6}, 3×10^{6}, 4×10^{6}, 5×10^{6}, 6×10^{6}, 7×10^{6}, 8×10^{6}, 9×10^{6}, 1×10^{7}, 2×10^{7}, 3×10^{7}, 4×10^{7}, 5×10^{7}, 6×10^{7}, 7×10^{7}, 8×10^{7}, 9×10^{7}, 1×10^{8}, 2×10^{8}, 3×10^{8}, 4×10^{8}, 5×10^{8}, 6×10^{8}, 7×10^{8}, 8×10^{8}, 9×10^{8}, 1×10^{9}, 2×10^{9}, 3×10^{9}, 4×10^{9}, 5×10^{9}, 6×10^{9}, 7×10^{9}, 8×10^{9}, 9×10^{9}, 1×10^{10}, 2×10^{10}, 3×10^{10}, 4×10^{10}, 5×10^{10}, 6×10^{10}, 7×10^{10}, 8×10^{10}, 9×10^{10}, 1×10^{11}, 2×10^{11}, 3×10^{11}, 4×10^{11}, 5×10^{11}, 6×10^{11}, 7×10^{11}, 8×10^{11}, 9×10^{11}, 1×10^{12}, 2×10^{12}, 3×10^{12}, 4×10^{12}, 5×10^{12}, 6×10^{12}, 7×10^{12}, 8×10^{12}, 9×10^{12}, 1×10^{13}, 2×10^{13}, 3×10^{13}, 4×10^{13}, 5×10^{13}, 6×10^{13}, 7×10^{13}, 8×10^{13} и 9×10^{13}. В одном варианте осуществления количество TIL, предоставленных в фармацевтических композициях по настоящему изобретению, находится в диапазоне от 1×10^{6} до 5×10^{6}, от 5×10^{6} до 1×10^{7}, от 1×10^{7} до 5×10^{7}, от 5×10^{7} до 1×10^{8}, от 1×10^{8} до 5×10^{8}, от 5×10^{8} до 1×10^{9}, от 1×10^{9} до 5×10^{9}, от 5×10^{9} до 1×10^{10}, от 1×10^{10} до 5×10^{10}, от 5×10^{10} до 1×10^{11}, от 5×10^{11} до 1×10^{12}, от 1×10^{12} до 5×10^{12} и от 5×10^{12} до 1×10^{13}.

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

В некоторых вариантах осуществления концентрация TIL, предоставленных в фармацевтических композициях по настоящему изобретению, составляет более 90%, 80%, 70%, 60%, 50%, 40%, 30%, 20%, 19,75%, 19,50%, 19,25%, 19%, 18,75%, 18,50%, 18,25% 18%, 17,75%, 17,50%, 17,25% 17%, 16,75%, 16,50%, 16,25% 16%, 15,75%, 15,50%, 15,25% 15%, 14,75%, 14,50%, 14,25% 14%, 13,75%, 13,50%, 13,25%

13%, 12,75%, 12,50%, 12,25% 12%, 11,75%, 11,50%, 11,25% 11%, 10,75%, 10,50%, 10,25%, 10%, 9,75%, 9,50%, 9,25% 9%, 8,75%, 8,50%, 8,25% 8%, 7,75%, 7,50%, 7,25% 7%, 6,75%, 6,50%, 6,25% 6%, 5,75%, 5,50%, 5,25% 5%, 4,75%, 4,50%, 4,25%, 4%, 3,75%, 3,50%, 3,25%, 3%, 2,75%, 2,50%, 2,25%, 2%, 1,75%, 1,50%, 125%, 1%, 0,5%, 0,4%, 0,3%, 0,2%, 0,1%, 0,09%, 0,08%, 0,07%, 0,06%, 0,05%, 0,04%, 0,03%, 0,02%, 0,01%, 0,009%, 0,008%, 0,007%, 0,006%, 0,005%, 0,004%, 0,003%, 0,002%, 0,001%, 0,0009%, 0,0008%, 0,0007%, 0,0006%, 0,0005%, 0,0004%, 0,0003%, 0,0002% или 0,0001% мас./мас., мас./об. или об./об. фармацевтической композиции.

В некоторых вариантах осуществления концентрация TIL, предоставленных в фармацевтических композициях по настоящему изобретению, находится в диапазоне от около 0,0001% до около 50%, от около 0,001% до около 40%, от около 0,01% до около 30%, от около 0,02% до около 29%, от около 0,03% до около 28%, от около 0,04% до около 27%, от около 0,05% до около 26%, от около 0,06% до около 25%, от около 0,07% до около 24%, от около 0,08% до около 23%, от около 0,09% до около 22%, от около 0,1% до около 21%, от около 0,2% до около 20%, от около 0,3% до около 19%, от около 0,4% до около 18%, от около 0,5% до около 17%, от около 0,6% до около 16%, от около 0,7% до около 15%, от около 0,8% до около 14%, от около 0,9% до около 12% или от около 1% до около 10% мас./мас., мас./об. или об./об. фармацевтической композиции.

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

В некоторых вариантах осуществления количество TIL, предоставленных в фармацевтических композициях по настоящему изобретению, равно или меньше 10 г, 9,5 г, 9,0 г, 8,5 г, 8,0 г, 7,5 г, 7,0 г, 6,5 г, 6,0 г, 5,5 г, 5,0 г, 4,5 г, 4,0 г, 3,5 г, 3,0 г, 2,5 г, 2,0 г, 1,5 г, 1,0 г, 0,95 г, 0,9 г, 0,85 г, 0,8 г, 0,75 г, 0,7 г, 0,65 г, 0,6 г, 0,55 г, 0,5 г, 0,45 г, 0,4 г, 0,35 г, 0,3 г, 0,25 г, 0,2 г, 0,15 г, 0,1 г, 0,09 г, 0,08 г, 0,07 г, 0,06 г, 0,05 г, 0,04 г, 0,03 г, 0,02 г, 0,01 г, 0,009 г, 0,008 г, 0,007 г, 0,006 г, 0,005 г, 0,004 г, 0,003 г, 0,002 г, 0,001 г, 0,0009 г, 0,0008 г, 0,0007 г, 0,0006 г, 0,0005 г, 0,0004 г, 0,0003 г, 0,0002 г или 0,0001 г.

В некоторых вариантах осуществления количество TIL, предоставленных в фармацевтических композициях по настоящему изобретению, составляет более 0,0001 г, 0,0002 г, 0,0003 г, 0,0004 г, 0,0005 г, 0,0006 г, 0,0007 г, 0,0008 г, 0,0009 г, 0,001 г, 0,0015 г, 0,002 г, 0,0025 г, 0,003 г, 0,0035 г, 0,004 г, 0,0045 г, 0,005 г, 0,0055 г, 0,006 г, 0,0065 г, 0,007 г, 0,0075 г, 0,008 г, 0,0085 г, 0,009 г, 0,0095 г, 0,01 г, 0,015 г, 0,02 г, 0,025 г, 0,03 г, 0,035 г, 0,04 г, 0,045 г, 0,05 г, 0,055 г, 0,06 г, 0,065 г, 0,07 г, 0,075 г, 0,08 г, 0,085 г, 0,09 г, 0,095 г, 0,1 г, 0,15 г, 0,2 г, 0,25 г, 0,3 г, 0,35 г, 0,4 г, 0,45 г, 0,5 г, 0,55 г, 0,6 г, 0,65 г, 0,7 г, 0,75 г, 0,8 г, 0,85 г, 0,9 г, 0,95 г, 1 г, 1,5 г, 2 г, 2,5, 3 г, 3,5, 4 г, 4,5 г, 5 г, 5,5 г, 6 г, 6,5 г, 7 г, 7,5 г, 8 г, 8,5 г, 9 г, 9,5 г или 10 г.

TIL, представленные в фармацевтических композициях по настоящему изобретению, эффективны в широком диапазоне доз. Точная доза 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 применять клинически установленные дозы TIL. Количества фармацевтических композиций, вводимых с помощью описанных в настоящем документе способов, таких как дозы TIL, будут зависеть от человека или млекопитающего, подвергающегося лечению, тяжести заболевания или состояния, скорости введения, расположения активных фармацевтических ингредиентов и на усмотрение лечащего врача.

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

В некоторых вариантах осуществления эффективная доза TIL составляет около 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 TIL находится в диапазоне от 1×10^6 до 5×10^6, от 5×10^6 до 1×10^7, от 1×10^7 до 5×10^7, от 5×10^7 до 1×10^8, от 1×10^8 до 5×10^8, от 5×10^8 до 1×10^9, от 1×10^9 до 5×10^9, от 5×10^9 до 1×10^{10}, от 1×10^{10} до 5×10^{10}, от 5×10^{10} до 1×10^{11}, от 5×10^{11} до 1×10^{12}, от 1×10^{12} до 5×10^{12} и от 5×10^{12} до 1×10^{13}.

В некоторых вариантах осуществления эффективная доза TIL находится в диапазоне от около 0,01 мг/кг до около 4,3 мг/кг, от около 0,15 мг/кг до около 3,6 мг/кг, от около 0,3 мг/кгдо около 3,2 мг/кг, от

около 0,35 мг/кг до около 2,85 мг/кг, от около 0,15 мг/кг до около 2,85 мг/кг, от около 0,3 мг/кг до около 2,15 мг/кг, от около 0,45 мг/кг до около 1,7 мг/кг, от около 0,15 мг/кг до около 1,3 мг/кг, от около 0,3 мг/кг до около 1,15 мг/кг, от около 0,45 мг/кг до около 1 мг/кг, от около 0,55 мг/кг до около 0,85 мг/кг, от около 0,65 мг/кг до от около 0,8 мг/кг, от около 0,7 мг/кг до около 0,75 мг/кг, от около 0,7 мг/кг до около 2,15 мг/кг, от около 0,85 мг/кг до около 2 мг/кг, от около 1 мг/кг до около 1,85 мг/кг, от около 1,15 мг/кг до около 1,7 мг/кг, от около 1,3 мг/кг до около 1,6 мг/кг, от около 1,35 мг/кг до около 1,5 мг/кг, от около 2,15 мг/кг до около 3,6 мг /кг, от около 2,3 мг/кг до около 3,4 мг/кг, от около 2,4 мг/кг до около 3,3 мг/кг, от около 2,6 мг/кг до около 3,15 мг/кг, от около 2,7 мг/кг до около 3 мг/кг, от около 2,8 мг/кг до около 3 мг/кг или от около 2,85 мг/кг до около 2,95 мг/кг.

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

Эффективное количество TIL можно вводить в виде однократной или многократной дозы любым из общепринятых способов введения агентов, обладающих сходными свойствами, включая интраназальный и чрескожный пути, путем внутриартериальной инъекции, внутривенно, внутрибрюшинно, парентерально, внутримышечно, подкожно, местно, трансплантацией или ингаляцией.

G. Необязательные анализы на жизнеспособность клеток.

Необязательно анализ на жизнеспособность клеток можно проводить после первого размножения на этапе B с помощью стандартных анализов, известных в данной области техники. Например, для образца суммарных TIL можно проводить анализ с трипановым синим, который избирательно метит мертвые клетки и позволяет оценивать жизнеспособность. Другие анализы для тестирования жизнеспособности могут включать, помимо прочего, анализ с аламаровым синим и анализ MTT.

1. Количество клеток, жизнеспособность, проточная цитометрия.

В некоторых вариантах осуществления измеряют количество и/или жизнеспособность клеток. Экспрессию маркеров, таких как, но без ограничения, CD3, CD4, CD8 и CD56, а также любых других, раскрытых или описанных в настоящем документе, можно измерять методом проточной цитометрии с антителами, например, но без ограничения, теми, которые коммерчески доступны от компании BD Biosciences (BD Biosciences, Сан-Хосе, штат Калифорния), с помощью проточного питометра FACSCanto™ (BD Biosciences). Клетки можно подсчитывать вручную с помощью одноразового гемоцитометра C-chip (VWR, Батавия, штат Иллинойс), а жизнеспособность можно оценивать любым методом, известным в данной области техники, включая, помимо прочего, окрашивание трипановым синим.

В некоторых случаях популяцию суммарных TIL можно криоконсервировать немедленно с помощью протоколов, описанных ниже. Альтернативно популяция суммарных TIL может быть подвергнута REP, а затем криоконсервирована, как описано ниже. Аналогично, в случае, когда в терапии будут применяться генетически модифицированные TIL, популяции суммарных или REP TIL можно подвергать генетическим модификациям для подходящего лечения.

2. Клеточные культуры.

В одном варианте осуществления способ размножения TIL может включать применение от около 5000 мл до около 25000 мл культуральной среды для клеток, от около 5000 мл до около 10000 мл культуральной среды для клеток или от около 5800 мл до около 8700 мл культуральной среды для клеток. В одном варианте осуществления для размножения TIL применяют не более одного вида культуральной среды для клеток. Можно применять любую подходящую культуральную среду для клеток, например, культуральную среду для клеток AIM-V (L-глутамин, 50 мкМ стрептомицина сульфат и 10 мкМ гентамицина сульфат) (Invitrogen, Карлсбад, штат Калифорния). В этом отношении патентуемые способы обладают преимуществом уменьшения количества среды, а также числа видов сред, необходимых для размножения TIL. В одном варианте осуществления размножение TIL может включать добавление к клеткам свежей культуральной среды для клеток (также называемое подпиткой клеток) не чаще, чем каждый третий или четвертый день. Размножение клеток в газопроницаемом контейнере упрощает процедуры, необходимые для размножения клеток, за счет уменьшения частоты подпитки, необходимой для размножения клеток.

В варианте осуществления культуральная среда для клеток в первом и/или втором газопроницаемом контейнере является нефильтрованной. Применение нефильтрованной клеточной среды может упростить процедуры, необходимые для размножения клеток. В одном варианте осуществления в клеточной среде в первом и/или втором газопроницаемом контейнере отсутствует бета-меркаптоэтанол (BME).

В одном варианте осуществления продолжительность способа включает получение образца опухолевой ткани у млекопитающего; культивирование образца опухолевой ткани в первом газопроницаемом

контейнере, содержащем клеточную среду; получение TIL из образца опухолевой ткани; размножение TIL во втором газопроницаемом контейнере, содержащем клеточную среду, с помощью aAPC в течение периода от около 14 до около 42 дней, например, около 28 дней.

В одном варианте осуществления TIL размножают в газопроницаемых контейнерах. Газопроницаемые контейнеры применяли для размножения TIL с помощью PBMC посредством способов, композиций и устройств, известных в данной области техники, в том числе описанных в публикации заявки на патент США № 2005/0106717 A1, описание которой включено в настоящий документ посредством ссылки. В одном варианте осуществления TIL размножают в газопроницаемых мешках. В одном варианте осуществления TIL размножают с помощью системы размножения клеток, которая размножает TIL в газопроницаемых мешках, такой как Xuri Cell Expansion System W25 (GE Healthcare). В одном варианте осуществления TIL размножают с помощью системы размножения клеток, которая размножает TIL в газопроницаемых мешках, такой как биореакторная система WAVE, также известная как система размножения клеток Xuri W5 (GE Healthcare). В одном варианте осуществления система размножения клеток включает газопроницаемый мешок для клеток с объемом, выбранным из группы, состоящей из около 100 мл, около 200 мл, около 300 мл, около 400 мл, около 500 мл, около 600 мл, около 700 мл, около 800 мл, около 900 мл, около 1 л, около 2 л, около 3 л, около 4 л, около 5 л, около 6 л, около 7 л, около 8 л, около 9 л и около 10 л. В одном варианте осуществления TIL могут быть размножены в колбах G-Rex (коммерчески доступных от Wilson Wolf Manufacturing). Такие варианты осуществления позволяют размножить клеточную популяцию с около 5×10^5 клеток/см^2 до от 10×10^6 до 30×10^6 клеток/см^2. В одном варианте осуществления указанное размножение проводят без добавления к клеткам свежей культуральной среды для клеток (также называемого подпиткой клеток). В одном варианте осуществления это происходит без подпитки, пока среда находится на высоте около 10 см в колбе G-Rex. В одном варианте осуществления это происходит без подпитки, но с добавлением одного или более цитокинов. В одном варианте осуществления цитокин может быть добавлен в виде болюса без необходимости смешивания цитокина со средой. Такие контейнеры, устройства и способы известны в данной области техники и применялись для размножения TIL, включая описанные в публикации заявки на патент США № US 2014/0377739A1, международной публикации № WO 2014/210036 A1, публикации заявки на патент США № US 2013/0115617 A1, международной публикации № WO 2013/188427 A1, публикации заявки на патент США № US 2011/0136228 A1, патенте США № US 8809050 B2, международной публикации № WO 2011/072088 A2, публикации заявки на патент США № US 2016/0208216 A1, публикации заявки на патент США № US 2012/0244133 A1, международной публикации № WO 2012/129201 A1, публикации заявки на патент США № US 2013/0102075 A1, публикации заявки на патент США № US 8956860 B2, международной публикации № WO 2013/173835 A1, публикации заявки на патент США № US 2015/0175966 A1, описание которых включено в настоящий документ посредством ссылки. Такие процессы также описаны в Jin et al., J. Immunotherapy, 2012, 35:283-292. Необязательная генетическая модификация TIL

В некоторых вариантах осуществления TIL необязательно генетически модифицируют для включения дополнительных функциональных свойств, включая, помимо прочего, высокоаффинный Т-клеточный рецептор (TCR), например, TCR, нацеленный на опухолеассоциированный антиген, такой как MAGE-1, HER2 или NY-ESO-1, или химерный антигенный рецептор (CAR), который связывается с опухолеассоциированной молекулой клеточной поверхности (например, мезотелином) или линейно-специфической молекулой клеточной поверхности (например, CD19).

H. Необязательная криоконсервация TIL.

Как описано выше и приведено в качестве примера на этапах A-E на фиг. 9, криоконсервацию можно производить в различные моменты времени на всем протяжении процесса размножения TIL. В некоторых вариантах осуществления можно криоконсервировать размноженную популяцию TIL после второго размножения (как показано, например, для этапа D на фиг. 9). Криоконсервацию, как правило, можно выполнять, помещая популяцию TIL в раствор для замораживания, например, содержащий 85% сыворотки AB с инактивированным комплементом и 15% диметилсульфоксида (DMSO). Клетки в растворе помещают в криогенные флаконы и хранят в течение 24 ч при -80°C с необязательным переносом в морозильные камеры с газообразным азотом для криоконсервации, см. Sadeghi, et al., Acta Oncologica 2013, 52, 978-986. В некоторых вариантах осуществления TIL криоконсервируют в 5% DMSO. В некоторых вариантах осуществления TIL криоконсервируют в культуральной среде для клеток плюс 5% DMSO. В некоторых вариантах осуществления TIL криоконсервируют способами, описанными в примерах 8 и 9.

При необходимости, клетки извлекают из морозильной камеры и размораживают при 37°C в водяной бане до тех пор, пока не будет размерзено примерно 4/5 раствора. Клетки, как правило, ресуспендируют в полной среде и необязательно промывают один или более раз. В некоторых вариантах осуществления размороженные TIL можно подсчитывать и оценивать на жизнеспособность, как известно в данной области техники.

I. Фенотипические характеристики размноженных TIL.

В некоторых вариантах осуществления TIL анализируют на экспрессию множества маркеров фенотипа после размножения, включая описанных в настоящем документе и в примерах. В одном варианте

осуществления исследуют экспрессию одного или более фенотипических маркеров. В некоторых вариантах осуществления фенотипические характеристики TIL анализируют после первого размножения на этапе B. В некоторых вариантах осуществления фенотипические характеристики TIL анализируют во время перехода на этапе C. В некоторых вариантах осуществления фенотипические характеристики TIL анализируют во время перехода в соответствии с этапом C и после криоконсервации. В некоторых вариантах осуществления фенотипические характеристики TIL анализируют после второго размножения в соответствии с этапом D. В некоторых вариантах осуществления фенотипические характеристики TIL анализируют после двух или более размножений в соответствии с этапом D. В некоторых вариантах осуществления маркер выбран из группы, состоящей из TCRab (т.е. TCRα/β), CD57, CD28, CD4, CD27, CD56, CD8a, CD45RA, CD8a, CCR7, CD4, CD3, CD38 и HLA-DR. В некоторых вариантах осуществления маркер выбран из группы, состоящей из TCRab (т.е. TCRα/β), CD57, CD28, CD4, CD27, CD56 и CD8a. В одном варианте осуществления маркер выбран из группы, состоящей из CD45RA, CD8a, CCR7, CD4, CD3, CD38 и HLA-DR. В некоторых вариантах осуществления исследуют экспрессию одного, двух, трех, четырех, пяти, шести, семи, восьми, девяти, десяти, одиннадцати, двенадцати, тринадцати или четырнадцати маркеров. В некоторых вариантах осуществления исследуют экспрессию одного или более маркеров из каждой группы. В некоторых вариантах осуществления экспрессия одного или более HLA-DR, CD38 и CD69 сохраняется (т.е. не обнаруживает статистически значимой разницы) в свежих TIL в сравнении с размороженными TIL. В некоторых вариантах осуществления статус активации TIL сохраняется в размороженных TIL.

В одном варианте осуществления измеряют экспрессию одного или более регуляторных маркеров. В некоторых вариантах осуществления регуляторный маркер выбран из группы, состоящей из CD137, CD8a, Lag3, CD4, CD3, PD-1, TIM-3, CD69, CD8a, TIGIT, CD4, CD3, KLRG1 и CD154. В некоторых вариантах осуществления регуляторный маркер выбран из группы, состоящей из CD137, CD8a, Lag3, CD4, CD3, PD-1 и TIM-3. В некоторых вариантах осуществления регуляторный маркер выбран из группы, состоящей из CD69, CD8a, TIGIT, CD4, CD3, KLRG1 и CD154. В некоторых вариантах осуществления экспрессия регуляторных молекул снижена в размороженных TIL в сравнении со свежими TIL. В некоторых вариантах осуществления экспрессия регуляторных молекул LAG-3 и TIM-3 снижена в размороженных TIL в сравнении со свежими TIL. В некоторых вариантах осуществления нет существенной разницы в экспрессии CD4, CD8, NK, TCRαβ. В некоторых вариантах осуществления нет существенной разницы в экспрессии CD4, CD8, NK, TCRαβ и/или маркерах памяти в свежих TIL в сравнении с размороженными TIL. В некоторых вариантах осуществления нет существенной разницы в экспрессии CD4, CD8, NK, TCRαβ между TIL, полученными посредством способов, представленных в настоящем документе, как показано, например, на фиг. 9, и/или TIL, полученными способами, отличными от представленных в настоящем документе, включая, например, способы, отличные от представленных на фиг. 9.

В некоторых вариантах осуществления выбор первой популяции TIL, второй популяции TIL, третьей популяции TIL, собранной популяции TIL и/или терапевтической популяции TIL на основе экспрессии CD4, CD8 и/или NK, TCRαβ не выполняют во время любого из этапов, включая описанные выше или показанные, например, на фиг. 9. В некоторых вариантах осуществления выбор первой популяции TIL на основе экспрессии CD4, CD8 и/или NK, TCRαβ не выполняют. В некоторых вариантах осуществления выбор второй популяции TIL на основе экспрессии CD4, CD8 и/или NK, TCRαβ не выполняют. В некоторых вариантах осуществления выбор третьей популяции TIL на основе экспрессии CD4, CD8 и/или NK, TCRαβ не выполняют. В некоторых вариантах осуществления выбор собранной популяции TIL на основе экспрессии CD4, CD8 и/или NK, TCRαβ не выполняют. В некоторых вариантах осуществления выбор терапевтической популяции TIL на основе экспрессии CD4, CD8 и/или NK, TCRαβ не выполняют.

В одном варианте осуществления выбор первой популяции TIL, второй популяции TIL, третьей популяции TIL или собранной популяции TIL на основе экспрессии CD4, CD8 и/или NK, TCRαβ не выполняют ни на одном из этапов (a)-(f) способа размножения инфильтрирующих опухоль лимфоцитов (TIL) в терапевтическую популяцию TIL, включающего:

(a) получение первой популяции TIL из опухоли, резецированной у пациента, путем обработки образца опухоли, полученного от пациента, на множество фрагментов опухоли;

(b) добавление фрагментов опухоли в закрытую систему;

(c) выполнение первого размножения путем культивирования первой популяции TIL в культуральной среде для клеток, содержащей IL-2, с получением второй популяции TIL, причем первое размножение выполняют в закрытом контейнере, обеспечивающем первую газопроницаемую площадь поверхности, причем первое размножение выполняют в течение около 3-14 дней с получением второй популяции TIL, причем вторая популяция TIL в по меньшей мере 50 раз больше первой популяции TIL, и причем переход от этапа (b) к этапу (c) происходит без открытия системы;

(d) выполнение второго размножения путем добавления в культуральную среду для клеток второй популяции TIL дополнительных IL-2, OKT-3 и антигенпрезентирующих клеток (APC) с получением третьей популяции TIL, причем второе размножение выполняют в течение около 7-14 дней с получением

третьей популяции TIL, причем третья популяция TIL представляет собой терапевтическую популяцию TIL, которая включает увеличенную субпопуляцию эффекторных Т-клеток и/или центральных Т-клеток памяти в сравнении со второй популяцией TIL, причем второе размножение выполняют в закрытом контейнере, обеспечивающем вторую газопроницаемую площадь поверхности, и причем переход от этапа (c) к этапу (d) происходит без открытия системы;

(e) сбор терапевтической популяции TIL, полученной на этапе (d), причем переход от этапа (d) к этапу (e) происходит без открытия системы; и

(f) перенос собранной популяции TIL с этапа (e) в инфузионный пакет, причем перенос с этапа (e) на (f) происходит без открытия системы.

В одном варианте осуществления выбор первой популяции TIL, второй популяции TIL, третьей популяции TIL или собранной популяции TIL на основе экспрессии CD4, CD8 и/или NK, TCRαβ не выполняют ни на одном из этапов (a)-(h) способа лечения субъекта, больного раком, причем способ включает введение размноженных инфильтрирующих опухоль лимфоцитов (TIL) и включает:

(a) получение первой популяции TIL из опухоли, резецированной у субъекта, путем обработки образца опухоли, полученного от пациента, на множество фрагментов опухоли;

(b) добавление фрагментов опухоли в закрытую систему;

(c) выполнение первого размножения путем культивирования первой популяции TIL в культуральной среде для клеток, содержащей IL-2, с получением второй популяции TIL, причем первое размножение выполняют в закрытом контейнере, обеспечивающем первую газопроницаемую площадь поверхности, причем первое размножение выполняют в течение около 3-14 дней с получением второй популяции TIL, причем вторая популяция TIL в по меньшей мере 50 раз больше первой популяции TIL, и причем переход от этапа (b) к этапу (c) происходит без открытия системы;

(d) выполнение второго размножения путем добавления в культуральную среду для клеток второй популяции TIL дополнительных IL-2, OKT-3 и антигенпрезентирующих клеток (APC) с получением третьей популяции TIL, причем второе размножение выполняют в течение около 7-14 дней с получением третьей популяции TIL, причем третья популяция TIL представляет собой терапевтическую популяцию TIL, которая включает увеличенную субпопуляцию эффекторных Т-клеток и/или центральных Т-клеток памяти в сравнении со второй популяцией TIL, причем второе размножение выполняют в закрытом контейнере, обеспечивающем вторую газопроницаемую площадь поверхности, и причем переход от этапа (c) к этапу (d) происходит без открытия системы;

(e) сбор терапевтической популяции TIL, полученной на этапе (d), причем переход от этапа (d) к этапу (e) происходит без открытия системы; и

(f) перенос собранной популяции TIL с этапа (e) в инфузионный пакет, причем перенос с этапа (e) на (f) происходит без открытия;

(g) необязательно криоконсервацию инфузионного пакета, содержащего собранную популяцию TIL на этапе (f), с помощью процесса криоконсервации; и

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

В некоторых вариантах осуществления маркер памяти выбран из группы, состоящей из CCR7 и CD62L.

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

В одном варианте осуществления повторно стимулированные TIL также можно оценивать на высвобождение цитокинов с помощью анализов высвобождения цитокинов. В некоторых вариантах осуществления TIL можно оценивать на секрецию интерферона-7 (IFN-7) в ответ на стимуляцию либо OKT3, либо совместное культивирование с аутологичным расщеплением опухоли. Например, в вариантах осуществления, в которых применяют стимуляцию OKT3, TIL тщательно промывают и готовят дубликаты лунок с 1×10^5 клеток в 0,2 мл CM в 96-луночных планшетах с плоским дном, предварительно покрытых 0,1 или 1,0 мкг/мл OKT3, разведенного в фосфатно-солевом буфере. После инкубации в течение ночи супернатанты собирают и измеряют IFN-7 в супернатанте с помощью ELISA (Pierce/Endogen, Вобурн, штат Массачусетс). Для анализа совместного культивирования 1×10^5 клеток TIL помещают в 96-луночный планшет с аутологичными опухолевыми клетками. (Соотношение 1:1). После 24-часовой инкубации супернатанты собирают и можно количественно определить высвобождение IFN-7, например, с помощью ELISA.

Проточный цитометрический анализ биомаркеров клеточной поверхности: Образцы TIL разделяли на аликвоты для проточного цитометрического анализа маркеров клеточной поверхности, см. примеры 7, 8 и 9.

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

В одном варианте осуществления размноженные TIL анализируют на экспрессию множества маркеров фенотипа, включая описанных в настоящем документе и в примерах. В одном варианте осуществления исследуют экспрессию одного или более фенотипических маркеров. В некоторых вариантах осуществления маркер выбран из группы, состоящей из TCRab (т.е. TCRα/β), CD57, CD28, CD4, CD27, CD56, CD8a, CD45RA, CD8a, CCR7, CD4, CD3, CD38 и HLA-DR. В некоторых вариантах осуществления маркер выбран из группы, состоящей из TCRab (т.е. TCRα/β), CD57, CD28, CD4, CD27, CD56 и CD8a. В одном варианте осуществления маркер выбран из группы, состоящей из CD45RA, CD8a, CCR7, CD4, CD3, CD38 и HLA-DR. В некоторых вариантах осуществления исследуют экспрессию одного, двух, трех, четырех, пяти, шести, семи, восьми, девяти, десяти, одиннадцати, двенадцати, тринадцати или четырнадцати маркеров. В некоторых вариантах осуществления исследуют экспрессию одного или более маркеров из каждой группы. В некоторых вариантах осуществления экспрессия одного или более HLA-DR, CD38 и CD69 сохраняется (т.е. не обнаруживает статистически значимой разницы) в свежих TIL в сравнении с размороженными TIL. В некоторых вариантах осуществления статус активации TIL сохраняется в размороженных TIL.

В одном варианте осуществления измеряют экспрессию одного или более регуляторных маркеров. В некоторых вариантах осуществления регуляторный маркер выбран из группы, состоящей из CD137, CD8a, Lag3, CD4, CD3, PD1, TIM-3, CD69, CD8a, TIGIT, CD4, CD3, KLRG1 и CD154. В некоторых вариантах осуществления регуляторный маркер выбран из группы, состоящей из CD137, CD8a, Lag3, CD4, CD3, PD1 и TIM-3. В некоторых вариантах осуществления регуляторный маркер выбран из группы, состоящей из CD69, CD8a, TIGIT, CD4, CD3, KLRG1 и CD154. В некоторых вариантах осуществления экспрессия регуляторных молекул снижена в размороженных TIL в сравнении со свежими TIL. В некоторых вариантах осуществления экспрессия регуляторных молекул LAG-3 и TIM-3 снижена в размороженных TIL в сравнении со свежими TIL. В некоторых вариантах осуществления нет существенной разницы в экспрессии CD4, CD8, NK, TCRαβ. В некоторых вариантах осуществления нет существенной разницы в экспрессии CD4, CD8, NK, TCRαβ и/или маркерах памяти в свежих TIL в сравнении с размороженными TIL.

В некоторых вариантах осуществления маркер памяти выбран из группы, состоящей из CCR7 и CD62L.

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

В одном варианте осуществления повторно стимулированные TIL также можно оценивать на высвобождение цитокинов с помощью анализов высвобождения цитокинов. В некоторых вариантах осуществления TIL можно оценивать на секрецию интерферона-7 (IFN-7) в ответ на стимуляцию либо OKT3, либо совместное культивирование с аутологичным расщеплением опухоли. Например, в вариантах осу-

ществления, в которых применяют стимуляцию OKT3, TIL тщательно промывают и готовят дубликаты лунок с 1×10^5 клеток в 0,2 мл СМ в 96-луночных планшетах с плоским дном, предварительно покрытых 0,1 или 1,0 мкг/мл OKT3, разведенного в фосфатно-солевом буфере. После инкубации в течение ночи супернатанты собирают и измеряют IFN-7 в супернатанте с помощью ELISA (Pierce/Endogen, Вобурн, штат Массачусетс). Для анализа совместного культивирования 1×10^5 клеток TIL помещают в 96-луночный планшет с аутологичными опухолевыми клетками. (Соотношение 1:1). После 24-часовой инкубации супернатанты собирают и можно количественно определить высвобождение IFN-7, например, с помощью ELISA.

В некоторых вариантах осуществления TIL, которые демонстрируют секрецию гранзима B от более 3000 пг/10^6 TIL до 300000 пг/10^6 TIL, представляют собой TIL, получаемые способами размножения по настоящему изобретению, включая, например, способы, представленные на фиг. 2A и/или 2B, и/или 2C, и/или 9. В некоторых вариантах осуществления TIL, которые демонстрируют секрецию гранзима B более 3000 пг/10^6 TIL, более 5000 пг/10^6 TIL, более 7000 пг/10^6 TIL, более 9000 пг/10^6 TIL, более 11000 пг/10^6 TIL, более 13000 пг/10^6 TIL, более 15000 пг/10^6 TIL, более 17000 пг/10^6 TIL, более 19000 пг/10^6 TIL, более 20000 пг/10^6 TIL, более 40000 пг/10^6 TIL, более 60000 пг/10^6 TIL, более 80000 пг/10^6 TIL, более 100000 пг/10^6 TIL, более 120000 пг/10^6 TIL, более 140000 пг/10^6 TIL, более 160000 пг/10^6 TIL, более 180000 пг/10^6 TIL, более 200000 пг/10^6 TIL, более 220000 пг/10^6 TIL, более 240000 пг/10^6 TIL, более 260000 пг/10^6 TIL, более 280000 пг/10^6 TIL, более 300000 пг/10^6 TIL или более, представляют собой TIL, получаемые способами размножения по настоящему изобретению, включая, например, способы, представленные на фиг. 2A и/или 2B, и/или 2C, и/или 9. В некоторых вариантах осуществления TIL, которые демонстрируют секрецию гранзима B более 3000 пг/10^6 TIL, представляют собой TIL, получаемые способами размножения по настоящему изобретению, включая, например, способы, представленные на фиг. 2A и/или 2B, и/или 2C, и/или 9. В некоторых вариантах осуществления TIL, которые демонстрируют секрецию гранзима B более 5000 пг/10^6 TIL, представляют собой TIL, получаемые способами размножения по настоящему изобретению, включая, например, способы, представленные на фиг. 2A и/или 2B, и/или 2C, и/или 9. В некоторых вариантах осуществления TIL, которые демонстрируют секрецию гранзима B более 7000 пг/10^6 TIL, представляют собой TIL, получаемые способами размножения по настоящему изобретению, включая, например, способы, представленные на фиг. 2A и/или 2B, и/или 2C, и/или 9. В некоторых вариантах осуществления TIL, которые демонстрируют секрецию гранзима B более 9000 пг/10^6 TIL, представляют собой TIL, получаемые способами размножения по настоящему изобретению, включая, например, способы, представленные на фиг. 2A и/или 2B, и/или 2C, и/или 9. В некоторых вариантах осуществления TIL, которые демонстрируют секрецию гранзима B более 11000 пг/10^6 TIL, представляют собой TIL, получаемые способами размножения по настоящему изобретению, включая, например, способы, представленные на фиг. 2A и/или 2B, и/или 2C, и/или 9. В некоторых вариантах осуществления TIL, которые демонстрируют секрецию гранзима B более 13000 пг/10^6 TIL, представляют собой TIL, получаемые способами размножения по настоящему изобретению, включая, например, способы, представленные на фиг. 2A и/или 2B, и/или 2C, и/или 9. В некоторых вариантах осуществления TIL, которые демонстрируют секрецию гранзима B более 15000 пг/10^6 TIL, представляют собой TIL, получаемые способами размножения по настоящему изобретению, включая, например, способы, представленные на фиг. 2A и/или 2B, и/или 2C, и/или 9. В некоторых вариантах осуществления TIL, которые демонстрируют секрецию гранзима B более 17000 пг/10^6 TIL, представляют собой TIL, получаемые способами размножения по настоящему изобретению, включая, например, способы, представленные на фиг. 2A и/или 2B, и/или 2C, и/или 9. В некоторых вариантах осуществления TIL, которые демонстрируют секрецию гранзима B более 19000 пг/10^6 TIL, представляют собой TIL, получаемые способами размножения по настоящему изобретению, включая, например, способы, представленные на фиг. 2A и/или 2B, и/или 2C, и/или 9. В некоторых вариантах осуществления TIL, которые демонстрируют секрецию гранзима B более 20000 пг/10^6 TIL, представляют собой TIL, получаемые способами размножения по настоящему изобретению, включая, например, способы, представленные на фиг. 2A и/или 2B, и/или 2C, и/или 9. В некоторых вариантах осуществления TIL, которые демонстрируют секрецию гранзима B более 40000 пг/10^6 TIL, представляют собой TIL, получаемые способами размножения по настоящему изобретению, включая, например, способы, представленные на фиг. 2A и/или 2B, и/или 2C, и/или 9. В некоторых вариантах осуществления TIL, которые демонстрируют секрецию гранзима B более 60000 пг/10^6 TIL, представляют собой TIL, получаемые способами размножения по настоящему изобретению, включая, например, способы, представленные на фиг. 2A и/или 2B, и/или 2C, и/или 9. В некоторых вариантах осуществления TIL, которые демонстрируют секрецию гранзима B более 80000 пг/10^6 TIL, представляют собой TIL, получаемые способами размножения по настоящему изобретению, включая, например, способы, представленные на фиг. 2A и/или 2B, и/или 2C, и/или 9. В некоторых вариантах осуществления TIL, которые демонстрируют секрецию гранзима B более 100000 пг/10^6 TIL, представляют собой TIL, получаемые способами размножения по настоящему изобретению, включая, например, способы, представленные на фиг. 2A и/или 2B, и/или 2C, и/или 9. В некоторых вариантах осуществления TIL, которые демонстрируют секрецию гранзима B более 120000 пг/10^6 TIL, представля-

ют собой TIL, получаемые способами размножения по настоящему изобретению, включая, например, способы, представленные на фиг. 2A и/или 2B, и/или 2C, и/или 9. В некоторых вариантах осуществления TIL, которые демонстрируют секрецию гранзима B более 140000 пг/10^6 TIL, представляют собой TIL, получаемые способами размножения по настоящему изобретению, включая, например, способы, представленные на фиг. 2A и/или 2B, и/или 2C, и/или 9. В некоторых вариантах осуществления TIL, которые демонстрируют секрецию гранзима B более 160000 пг/10^6 TIL, представляют собой TIL, получаемые способами размножения по настоящему изобретению, включая, например, способы, представленные на фиг. 2A и/или 2B, и/или 2C, и/или 9. В некоторых вариантах осуществления TIL, которые демонстрируют секрецию гранзима B более 180000 пг/10^6 TIL, представляют собой TIL, получаемые способами размножения по настоящему изобретению, включая, например, способы, представленные на фиг. 2A и/или 2B, и/или 2C, и/или 9. В некоторых вариантах осуществления TIL, которые демонстрируют секрецию гранзима B более 200000 пг/10^6 TIL, представляют собой TIL, получаемые способами размножения по настоящему изобретению, включая, например, способы, представленные на фиг. 2A и/или 2B, и/или 2C, и/или 9. В некоторых вариантах осуществления TIL, которые демонстрируют секрецию гранзима B более 220000 пг/10^6 TIL, представляют собой TIL, получаемые способами размножения по настоящему изобретению, включая, например, способы, представленные на фиг. 2A и/или 2B, и/или 2C, и/или 9. В некоторых вариантах осуществления TIL, которые демонстрируют секрецию гранзима B более 240000 пг/10^6 TIL, представляют собой TIL, получаемые способами размножения по настоящему изобретению, включая, например, способы, представленные на фиг. 2A и/или 2B, и/или 2C, и/или 9. В некоторых вариантах осуществления TIL, которые демонстрируют секрецию гранзима B более 260000 пг/10^6 TIL, представляют собой TIL, получаемые способами размножения по настоящему изобретению, включая, например, способы, представленные на фиг. 2A и/или 2B, и/или 2C, и/или 9. В некоторых вариантах осуществления TIL, которые демонстрируют секрецию гранзима B более 280000 пг/10^6 TIL, представляют собой TIL, получаемые способами размножения по настоящему изобретению, включая, например, способы, представленные на фиг. 2A и/или 2B, и/или 2C, и/или 9. В некоторых вариантах осуществления TIL, которые демонстрируют секрецию гранзима B более 300000 пг/10^6 TIL, представляют собой TIL, получаемые способами размножения по настоящему изобретению, включая, например, способы, представленные на фиг. 2A и/или 2B, и/или 2C, и/или 9. В некоторых вариантах осуществления TIL, которые демонстрируют секрецию гранзима B от более 3000 пг/10^6 TIL до 300000 пг/10^6 TIL, представляют собой TIL, получаемые способами размножения по настоящему изобретению, включая, например, способы, представленные на фиг. 2A и/или 2B, и/или 2C, и/или 9. В некоторых вариантах осуществления TIL, которые демонстрируют секрецию гранзима B более 3000 пг/10^6 TIL, более 5000 пг/10^6 TIL, более 7000 пг/10^6 TIL, более 9000 пг/10^6 TIL, более 11000 пг/10^6 TIL, более 13000 пг/10^6 TIL, более 15000 пг/10^6 TIL, более 17000 пг/10^6 TIL, более 19000 пг/10^6 TIL, более 20000 пг/10^6 TIL, более 40000 пг/10^6 TIL, более 60000 пг/10^6 TIL, более 80000 пг/10^6 TIL, более 100000 пг/10^6 TIL, более 120000 пг/10^6 TIL, более 140000 пг/10^6 TIL, более 160000 пг/10^6 TIL, более 180000 пг/10^6 TIL, более 200000 пг/10^6 TIL, более 220000 пг/10^6 TIL, более 240000 пг/10^6 TIL, более 260000 пг/10^6 TIL, более 280000 пг/10^6 TIL, более 300000 пг/10^6 TIL или более, представляют собой TIL, получаемые способами размножения по настоящему изобретению, включая, например, способы, представленные на фиг. 2A и/или 2B, и/или 2C, и/или 9. В некоторых вариантах осуществления TIL, которые демонстрируют секрецию гранзима B более 3000 пг/10^6 TIL, представляют собой TIL, получаемые способами размножения по настоящему изобретению, включая, например, способы, представленные на фиг. 2A и/или 2B, и/или 2C, и/или 9. В некоторых вариантах осуществления TIL, которые демонстрируют секрецию гранзима B более 5000 пг/10^6 TIL, представляют собой TIL, получаемые способами размножения по настоящему изобретению, включая, например, способы, представленные на фиг. 2A и/или 2B, и/или 2C, и/или 9. В некоторых вариантах осуществления TIL, которые демонстрируют секрецию гранзима B более 7000 пг/10^6 TIL, представляют собой TIL, получаемые способами размножения по настоящему изобретению, включая, например, способы, представленные на фиг. 2A и/или 2B, и/или 2C, и/или 9. В некоторых вариантах осуществления TIL, которые демонстрируют секрецию гранзима B более 9000 пг/10^6 TIL, представляют собой TIL, получаемые способами размножения по настоящему изобретению, включая, например, способы, представленные на фиг. 2A и/или 2B, и/или 2C, и/или 9. В некоторых вариантах осуществления TIL, которые демонстрируют секрецию гранзима B более 11000 пг/10^6 TIL, представляют собой TIL, получаемые способами размножения по настоящему изобретению, включая, например, способы, представленные на фиг. 2A и/или 2B, и/или 2C, и/или 9. В некоторых вариантах осуществления TIL, которые демонстрируют секрецию гранзима B более 13000 пг/10^6 TIL, представляют собой TIL, получаемые способами размножения по настоящему изобретению, включая, например, способы, представленные на фиг. 2A и/или 2B, и/или 2C, и/или 9. В некоторых вариантах осуществления TIL, которые демонстрируют секрецию гранзима B более 15000 пг/10^6 TIL, представляют собой TIL, получаемые способами размножения по настоящему изобретению, включая, например, способы, представленные на фиг. 2A и/или 2B, и/или 2C, и/или 9. В некоторых вариантах осуществления TIL, которые демонстрируют секрецию гранзима B более 17000 пг/10^6 TIL, представляют собой TIL, получаемые способами размножения по настоящему изобретению, включая, например, способы, представленные на фиг. 2A и/или 2B, и/или 2C, и/или 9. В некоторых вариантах

осуществления TIL, которые демонстрируют секрецию гранзима B более 19000 пг/10^6 TIL, представляют собой TIL, получаемые способами размножения по настоящему изобретению, включая, например, способы, представленные на фиг. 2A и/или 2B, и/или 2C, и/или 9. В некоторых вариантах осуществления TIL, которые демонстрируют секрецию гранзима B более 20000 пг/10^6 TIL, представляют собой TIL, получаемые способами размножения по настоящему изобретению, включая, например, способы, представленные на фиг. 2A и/или 2B, и/или 2C, и/или 9. В некоторых вариантах осуществления TIL, которые демонстрируют секрецию гранзима B более 40000 пг/10^6 TIL, представляют собой TIL, получаемые способами размножения по настоящему изобретению, включая, например, способы, представленные на фиг. 2A и/или 2B, и/или 2C, и/или 9. В некоторых вариантах осуществления TIL, которые демонстрируют секрецию гранзима B более 60000 пг/10^6 TIL, представляют собой TIL, получаемые способами размножения по настоящему изобретению, включая, например, способы, представленные на фиг. 2A и/или 2B, и/или 2C, и/или 9. В некоторых вариантах осуществления TIL, которые демонстрируют секрецию гранзима B более 80000 пг/10^6 TIL, представляют собой TIL, получаемые способами размножения по настоящему изобретению, включая, например, способы, представленные на фиг. 2A и/или 2B, и/или 2C, и/или 9. В некоторых вариантах осуществления TIL, которые демонстрируют секрецию гранзима B более 100000 пг/10^6 TIL, представляют собой TIL, получаемые способами размножения по настоящему изобретению, включая, например, способы, представленные на фиг. 2A и/или 2B, и/или 2C, и/или 9. В некоторых вариантах осуществления TIL, которые демонстрируют секрецию гранзима B более 120000 пг/10^6 TIL, представляют собой TIL, получаемые способами размножения по настоящему изобретению, включая, например, способы, представленные на фиг. 2A и/или 2B, и/или 2C, и/или 9. В некоторых вариантах осуществления TIL, которые демонстрируют секрецию гранзима B более 140000 пг/10^6 TIL, представляют собой TIL, получаемые способами размножения по настоящему изобретению, включая, например, способы, представленные на фиг. 2A и/или 2B, и/или 2C, и/или 9. В некоторых вариантах осуществления TIL, которые демонстрируют секрецию гранзима B более 160000 пг/10^6 TIL, представляют собой TIL, получаемые способами размножения по настоящему изобретению, включая, например, способы, представленные на фиг. 2A и/или 2B, и/или 2C, и/или 9. В некоторых вариантах осуществления TIL, которые демонстрируют секрецию гранзима B более 180000 пг/10^6 TIL, представляют собой TIL, получаемые способами размножения по настоящему изобретению, включая, например, способы, представленные на фиг. 2A и/или 2B, и/или 2C, и/или 9. В некоторых вариантах осуществления TIL, которые демонстрируют секрецию гранзима B более 200000 пг/10^6 TIL, представляют собой TIL, получаемые способами размножения по настоящему изобретению, включая, например, способы, представленные на фиг. 2A и/или 2B, и/или 2C, и/или 9. В некоторых вариантах осуществления TIL, которые демонстрируют секрецию гранзима B более 220000 пг/10^6 TIL, представляют собой TIL, получаемые способами размножения по настоящему изобретению, включая, например, способы, представленные на фиг. 2A и/или 2B, и/или 2C, и/или 9. В некоторых вариантах осуществления TIL, которые демонстрируют секрецию гранзима B более 240000 пг/10^6 TIL, представляют собой TIL, получаемые способами размножения по настоящему изобретению, включая, например, способы, представленные на фиг. 2A и/или 2B, и/или 2C, и/или 9. В некоторых вариантах осуществления TIL, которые демонстрируют секрецию гранзима B более 260000 пг/10^6 TIL, представляют собой TIL, получаемые способами размножения по настоящему изобретению, включая, например, способы, представленные на фиг. 2A и/или 2B, и/или 2C, и/или 9. В некоторых вариантах осуществления TIL, которые демонстрируют секрецию гранзима B более 280000 пг/10^6 TIL, представляют собой TIL, получаемые способами размножения по настоящему изобретению, включая, например, способы, представленные на фиг. 2A и/или 2B, и/или 2C, и/или 9. В некоторых вариантах осуществления TIL, которые демонстрируют секрецию гранзима B более 300000 пг/10^6 TIL, представляют собой TIL, получаемые способами размножения по настоящему изобретению, включая, например, способы, представленные на фиг. 2A и/или 2B, и/или 2C, и/или 9.

В некоторых вариантах осуществления TIL, которые демонстрируют секрецию гранзима B от более 1000 пг/мл до 300000 пг/мл или более, представляют собой TIL, получаемые способами размножения по настоящему изобретению, включая, например, способы, представленные на фиг. 2A и/или 2B, и/или 2C, и/или 9. В некоторых вариантах осуществления TIL, которые демонстрируют секрецию гранзима B более 1000 пг/мл, более 2000 пг/мл, более 3000 пг/мл, более 4000 пг/мл, более 5000 пг/мл, более 6000 пг/мл, более 7000 пг/мл, более 8000 пг/мл, более 9000 пг/мл, более 10000 пг/мл, более 20000 пг/мл, более 30000 пг/мл, более 40000 пг/мл, более 50000 пг/мл, более 60000 пг/мл, более 70000 пг/мл, более 80000 пг/мл, более 90000 пг/мл, более 100000 пг/мл или более представляют собой TIL, получаемые способами размножения по настоящему изобретению, включая, например, способы, представленные на фиг. 2A и/или 2B, и/или 2C, и/или 9. В некоторых вариантах осуществления TIL, которые демонстрируют секрецию гранзима B более 1000 пг/мл, представляют собой TIL, получаемые способами размножения по настоящему изобретению, включая, например, способы, представленные на фиг. 2A и/или 2B, и/или 2C, и/или 9. В некоторых вариантах осуществления TIL, которые демонстрируют секрецию гранзима B более 2000 пг/мл, представляют собой TIL, получаемые способами размножения по настоящему изобретению, включая, например, способы, представленные на фиг. 2A и/или 2B, и/или 2C, и/или 9. В некоторых вариантах осуществления TIL, которые демонстрируют секрецию гранзима B более

3000 пг/мл, представляют собой TIL, получаемые способами размножения по настоящему изобретению, включая, например, способы, представленные на фиг. 2A и/или 2B, и/или 2C, и/или 9. В некоторых вариантах осуществления TIL, которые демонстрируют секрецию гранзима B более 4000 пг/мл, представляют собой TIL, получаемые способами размножения по настоящему изобретению, включая, например, способы, представленные на фиг. 2A и/или 2B, и/или 2C, и/или 9. В некоторых вариантах осуществления TIL, которые демонстрируют секрецию гранзима B более 5000 пг/мл, представляют собой TIL, получаемые способами размножения по настоящему изобретению, включая, например, способы, представленные на фиг. 2A и/или 2B, и/или 2C, и/или 9. В некоторых вариантах осуществления TIL, которые демонстрируют секрецию гранзима B более 6000 пг/мл, представляют собой TIL, получаемые способами размножения по настоящему изобретению, включая, например, способы, представленные на фиг. 2A и/или 2B, и/или 2C, и/или 9. В некоторых вариантах осуществления TIL, которые демонстрируют секрецию гранзима B более 7000 пг/мл, представляют собой TIL, получаемые способами размножения по настоящему изобретению, включая, например, способы, представленные на фиг. 2A и/или 2B, и/или 2C, и/или 9. В некоторых вариантах осуществления TIL, которые демонстрируют секрецию гранзима B более 8000 пг/мл, представляют собой TIL, получаемые способами размножения по настоящему изобретению, включая, например, способы, представленные на фиг. 2A и/или 2B, и/или 2C, и/или 9. В некоторых вариантах осуществления TIL, которые демонстрируют секрецию гранзима B более 9000 пг/мл, представляют собой TIL, получаемые способами размножения по настоящему изобретению, включая, например, способы, представленные на фиг. 2A и/или 2B, и/или 2C, и/или 9. В некоторых вариантах осуществления TIL, которые демонстрируют секрецию гранзима B более 10000 пг/мл, представляют собой TIL, получаемые способами размножения по настоящему изобретению, включая, например, способы, представленные на фиг. 2A и/или 2B, и/или 2C, и/или 9. В некоторых вариантах осуществления TIL, которые демонстрируют секрецию гранзима B более 20000 пг/мл, представляют собой TIL, получаемые способами размножения по настоящему изобретению, включая, например, способы, представленные на фиг. 2A и/или 2B, и/или 2C, и/или 9. В некоторых вариантах осуществления TIL, которые демонстрируют секрецию гранзима B более 30000 пг/мл, представляют собой TIL, получаемые способами размножения по настоящему изобретению, включая, например, способы, представленные на фиг. 2A и/или 2B, и/или 2C, и/или 9. В некоторых вариантах осуществления TIL, которые демонстрируют секрецию гранзима B более 40000 пг/мл, представляют собой TIL, получаемые способами размножения по настоящему изобретению, включая, например, способы, представленные на фиг. 2A и/или 2B, и/или 2C, и/или 9. В некоторых вариантах осуществления TIL, которые демонстрируют секрецию гранзима B более 50000 пг/мл, представляют собой TIL, получаемые способами размножения по настоящему изобретению, включая, например, способы, представленные на фиг. 2A и/или 2B, и/или 2C, и/или 9. В некоторых вариантах осуществления TIL, которые демонстрируют секрецию гранзима B более 60000 пг/мл, представляют собой TIL, получаемые способами размножения по настоящему изобретению, включая, например, способы, представленные на фиг. 2A и/или 2B, и/или 2C, и/или 9. В некоторых вариантах осуществления TIL, которые демонстрируют секрецию гранзима B более 70000 пг/мл, представляют собой TIL, получаемые способами размножения по настоящему изобретению, включая, например, способы, представленные на фиг. 2A и/или 2B, и/или 2C, и/или 9. В некоторых вариантах осуществления TIL, которые демонстрируют секрецию гранзима B более 80000 пг/мл, представляют собой TIL, получаемые способами размножения по настоящему изобретению, включая, например, способы, представленные на фиг. 2A и/или 2B, и/или 2C, и/или 9. В некоторых вариантах осуществления TIL, которые демонстрируют секрецию гранзима B более 90000 пг/мл, представляют собой TIL, получаемые способами размножения по настоящему изобретению, включая, например, способы, представленные на фиг. 2A и/или 2B, и/или 2C, и/или 9. В некоторых вариантах осуществления TIL, которые демонстрируют секрецию гранзима B более 100000 пг/мл, представляют собой TIL, получаемые способами размножения по настоящему изобретению, включая, например, способы, представленные на фиг. 2A и/или 2B, и/или 2C, и/или 9. В некоторых вариантах осуществления TIL, которые демонстрируют секрецию гранзима B более 120000 пг/мл, представляют собой TIL, получаемые способами размножения по настоящему изобретению, включая, например, способы, представленные на фиг. 2A и/или 2B, и/или 2C, и/или 9. В некоторых вариантах осуществления TIL, которые демонстрируют секрецию гранзима B более 140000 пг/мл, представляют собой TIL, получаемые способами размножения по настоящему изобретению, включая, например, способы, представленные на фиг. 2A и/или 2B, и/или 2C, и/или 9. В некоторых вариантах осуществления TIL, которые демонстрируют секрецию гранзима B более 160000 пг/мл, представляют собой TIL, получаемые способами размножения по настоящему изобретению, включая, например, способы, представленные на фиг. 2A и/или 2B, и/или 2C, и/или 9. В некоторых вариантах осуществления TIL, которые демонстрируют секрецию гранзима B более 180000 пг/мл, представляют собой TIL, получаемые способами размножения по настоящему изобретению, включая, например, способы, представленные на фиг. 2A и/или 2B, и/или 2C, и/или 9. В некоторых вариантах осуществления TIL, которые демонстрируют секрецию гранзима B более 200000 пг/мл, представляют собой TIL, получаемые способами размножения по настоящему изобретению, включая, например, способы, представленные на фиг. 2A и/или 2B, и/или 2C, и/или 9. В некоторых вариантах осуществления TIL, которые демонстрируют секрецию гранзима B более 220000 пг/мл, представляют собой TIL,

получаемые способами размножения по настоящему изобретению, включая, например, способы, представленные на фиг. 2A и/или 2B, и/или 2C, и/или 9. В некоторых вариантах осуществления TIL, которые демонстрируют секрецию гранзима B более 240000 пг/мл, представляют собой TIL, получаемые способами размножения по настоящему изобретению, включая, например, способы, представленные на фиг. 2A и/или 2B, и/или 2C, и/или 9. В некоторых вариантах осуществления TIL, которые демонстрируют секрецию гранзима B более 260000 пг/мл, представляют собой TIL, получаемые способами размножения по настоящему изобретению, включая, например, способы, представленные на фиг. 2A и/или 2B, и/или 2C, и/или 9. В некоторых вариантах осуществления TIL, которые демонстрируют секрецию гранзима B более 280000 пг/мл, представляют собой TIL, получаемые способами размножения по настоящему изобретению, включая, например, способы, представленные на фиг. 2A и/или 2B, и/или 2C, и/или 9. В некоторых вариантах осуществления TIL, которые демонстрируют секрецию гранзима B более 300000 пг/мл, представляют собой TIL, получаемые способами размножения по настоящему изобретению, включая, например, способы, представленные на фиг. 2A и/или 2B, и/или 2C, и/или 9.

В некоторых вариантах осуществления способы размножения по настоящему изобретению производят размноженную популяцию TIL, которая проявляет повышенную секрецию гранзима B in vitro, включая, например, TIL, представленные на фиг. 2A и/или 2B, и/или 2C, и/или 9, в сравнении с неразмноженной популяцией TIL. В некоторых вариантах осуществления секреция гранзима B размноженной популяции TIL по настоящему изобретению увеличивается в по меньшей мере один-пятьдесят раз или более в сравнении с неразмноженной популяцией TIL. В некоторых вариантах осуществления секреция IFN-γ увеличивается в по меньшей мере один раз, по меньшей мере два раза, по меньшей мере три раза, по меньшей мере четыре раза, по меньшей мере пять раз, по меньшей мере шесть раз, по меньшей семь раз, по меньшей восемь раз, по меньшей девять раз, по меньшей десять раз, по меньшей двадцать раз, по меньшей тридцать раз, по меньшей сорок раз, по меньшей пятьдесят раз и более в сравнении с неразмноженной популяцией TIL. В некоторых вариантах осуществления секреция гранзима B размноженной популяции TIL по настоящему изобретению увеличивается в по меньшей мере один раз в сравнении с неразмноженной популяцией TIL. В некоторых вариантах осуществления секреция гранзима B размноженной популяции TIL по настоящему изобретению увеличивается в по меньшей мере два раза в сравнении с неразмноженной популяцией TIL. В некоторых вариантах осуществления секреция гранзима B размноженной популяции TIL по настоящему изобретению увеличивается в по меньшей мере три раза в сравнении с неразмноженной популяцией TIL. В некоторых вариантах осуществления секреция гранзима B размноженной популяции TIL по настоящему изобретению увеличивается в по меньшей мере четыре раза в сравнении с неразмноженной популяцией TIL. В некоторых вариантах осуществления секреция гранзима B размноженной популяции TIL по настоящему изобретению увеличивается в по меньшей мере пять раз в сравнении с неразмноженной популяцией TIL. В некоторых вариантах осуществления секреция гранзима B размноженной популяции TIL по настоящему изобретению увеличивается в по меньшей мере шесть раз в сравнении с неразмноженной популяцией TIL. В некоторых вариантах осуществления секреция гранзима B размноженной популяции TIL по настоящему изобретению увеличивается в по меньшей мере семь раз в сравнении с неразмноженной популяцией TIL. В некоторых вариантах осуществления секреция гранзима B размноженной популяции TIL по настоящему изобретению увеличивается в по меньшей мере восемь раз в сравнении с неразмноженной популяцией TIL. В некоторых вариантах осуществления секреция гранзима B размноженной популяции TIL по настоящему изобретению увеличивается в по меньшей мере девять раз в сравнении с неразмноженной популяцией TIL. В некоторых вариантах осуществления секреция гранзима B размноженной популяции TIL по настоящему изобретению увеличивается в по меньшей мере десять раз в сравнении с неразмноженной популяцией TIL. В некоторых вариантах осуществления секреция гранзима B размноженной популяции TIL по настоящему изобретению увеличивается в по меньшей мере двадцать раз в сравнении с неразмноженной популяцией TIL. В некоторых вариантах осуществления секреция гранзима B размноженной популяции TIL по настоящему изобретению увеличивается в по меньшей мере тридцать раз в сравнении с неразмноженной популяцией TIL. В некоторых вариантах осуществления секреция гранзима B размноженной популяции TIL по настоящему изобретению увеличивается в по меньшей мере сорок раз в сравнении с неразмноженной популяцией TIL. В некоторых вариантах осуществления секреция гранзима B размноженной популяции TIL по настоящему изобретению увеличивается в по меньшей мере пятьдесят раз в сравнении с неразмноженной популяцией TIL.

В некоторых вариантах осуществления фенотипическую характеристику исследуют после криоконсервации.

J. Метаболическое здоровье размноженных TIL.

Повторно стимулированные TIL характеризуются значительным усилением базального гликолиза в сравнении со свежесобранными TIL и/или TIL после разморозки. В одном варианте осуществления выбор первой популяции TIL, второй популяции TIL, третьей популяции TIL, собранной популяции TIL и/или терапевтической популяции TIL на основе экспрессии CD8 не выполняют во время любого из этапов, включая описанные выше или показанные, например, на фиг. 9. В некоторых вариантах осуществления выбор первой популяции TIL на основе экспрессии CD8 не выполняют. В некоторых вариантах

осуществления выбор второй популяции TIL на основе экспрессии CD8 не выполняют. В некоторых вариантах осуществления выбор третьей популяции TIL на основе экспрессии CD8 и не выполняют. В некоторых вариантах осуществления выбор собранной популяции TIL на основе экспрессии CD8 не выполняют. В некоторых вариантах осуществления выбор терапевтической популяции TIL на основе экспрессии CD8 не выполняют.

В одном варианте осуществления выбор первой популяции TIL, второй популяции TIL, третьей популяции TIL или собранной популяции TIL на основе экспрессии CD8 не выполняют ни на одном из этапов (a)-(f) способа размножения инфильтрирующих опухоль лимфоцитов (TIL) в терапевтическую популяцию TIL, включающего:

(a) получение первой популяции TIL из опухоли, резецированной у пациента, путем обработки образца опухоли, полученного от пациента, на множество фрагментов опухоли;

(b) добавление фрагментов опухоли в закрытую систему;

(c) выполнение первого размножения путем культивирования первой популяции TIL в культуральной среде для клеток, содержащей IL-2, с получением второй популяции TIL, причем первое размножение выполняют в закрытом контейнере, обеспечивающем первую газопроницаемую площадь поверхности, причем первое размножение выполняют в течение около 3-14 дней с получением второй популяции TIL, причем вторая популяция TIL в по меньшей мере 50 раз больше первой популяции TIL, и причем переход от этапа (b) к этапу (c) происходит без открытия системы;

(d) выполнение второго размножения путем добавления в культуральную среду для клеток второй популяции TIL дополнительных IL-2, OKT-3 и антигенпрезентирующих клеток (APC) с получением третьей популяции TIL, причем второе размножение выполняют в течение около 7-14 дней с получением третьей популяции TIL, причем третья популяция TIL представляет собой терапевтическую популяцию TIL, которая включает увеличенную субпопуляцию эффекторных Т-клеток и/или центральных Т-клеток памяти в сравнении со второй популяцией TIL, причем второе размножение выполняют в закрытом контейнере, обеспечивающем вторую газопроницаемую площадь поверхности, и причем переход от этапа (c) к этапу (d) происходит без открытия системы;

(e) сбор терапевтической популяции TIL, полученной на этапе (d), причем переход от этапа (d) к этапу (e) происходит без открытия системы; и

(f) перенос собранной популяции TIL с этапа (e) в инфузионный пакет, причем перенос с этапа (e) на (f) происходит без открытия системы.

В одном варианте осуществления выбор первой популяции TIL, второй популяции TIL, третьей популяции TIL или собранной популяции TIL на основе экспрессии CD8 и не выполняют ни на одном из этапов (a)-(h) способа лечения субъекта, больного раком, причем способ включает введение размноженных инфильтрирующих опухоль лимфоцитов (TIL) и включает:

(a) получение первой популяции TIL из опухоли, резецированной у субъекта, путем обработки образца опухоли, полученного от пациента, на множество фрагментов опухоли;

(b) добавление фрагментов опухоли в закрытую систему;

(c) выполнение первого размножения путем культивирования первой популяции TIL в культуральной среде для клеток, содержащей IL-2, с получением второй популяции TIL, причем первое размножение выполняют в закрытом контейнере, обеспечивающем первую газопроницаемую площадь поверхности, причем первое размножение выполняют в течение около 3-14 дней с получением второй популяции TIL, причем вторая популяция TIL в по меньшей мере 50 раз больше первой популяции TIL, и причем переход от этапа (b) к этапу (c) происходит без открытия системы;

(d) выполнение второго размножения путем добавления в культуральную среду для клеток второй популяции TIL дополнительных IL-2, OKT-3 и антигенпрезентирующих клеток (APC) с получением третьей популяции TIL, причем второе размножение выполняют в течение около 7-14 дней с получением третьей популяции TIL, причем третья популяция TIL представляет собой терапевтическую популяцию TIL, которая включает увеличенную субпопуляцию эффекторных Т-клеток и/или центральных Т-клеток памяти в сравнении со второй популяцией TIL, причем второе размножение выполняют в закрытом контейнере, обеспечивающем вторую газопроницаемую площадь поверхности, и причем переход от этапа (c) к этапу (d) происходит без открытия системы;

(e) сбор терапевтической популяции TIL, полученной на этапе (d), причем переход от этапа (d) к этапу (e) происходит без открытия системы; и

(f) перенос собранной популяции TIL с этапа (e) в инфузионный пакет, причем перенос с этапа (e) на (f) происходит без открытия;

(g) необязательно криоконсервацию инфузионного пакета, содержащего собранную популяцию TIL на этапе (f), с помощью процесса криоконсервации; и

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

TIL, полученные способами, описанными в настоящем документе, характеризуются значительным усилением базального гликолиза по сравнению, например, со свежесобранными TIL и/или TIL, полученными способами, отличными от описанных в настоящем документе, включая, например, способы, от-

личные от представленных на фиг. 9. В одном варианте осуществления выбор первой популяции TIL, второй популяции TIL, третьей популяции TIL, собранной популяции TIL и/или терапевтической популяции TIL на основе экспрессии CD8 не выполняют во время любого из этапов, включая описанные выше или показанные, например, на фиг. 9. В некоторых вариантах осуществления выбор первой популяции TIL на основе экспрессии CD8 не выполняют. В некоторых вариантах осуществления выбор второй популяции TIL на основе экспрессии CD8 не выполняют. В некоторых вариантах осуществления выбор третьей популяции TIL на основе экспрессии CD8 и не выполняют. В некоторых вариантах осуществления выбор собранной популяции TIL на основе экспрессии CD8 не выполняют. В некоторых вариантах осуществления выбор терапевтической популяции TIL на основе экспрессии CD8 не выполняют. В одном варианте осуществления выбор первой популяции TIL, второй популяции TIL, третьей популяции TIL или собранной популяции TIL на основе экспрессии CD8 не выполняют ни на одном из этапов (a)-(h).

Запасная дыхательная способность (SRC) и гликолитический резерв могут быть оценены для размноженных TIL с помощью различных способов по настоящему изобретению. Стресс-тест Seahorse XF Cell Mito измеряет митохондриальную функцию путем прямого измерения скорости потребления кислорода (OCR) клетками с помощью модуляторов дыхания, нацеленных на компоненты цепи переноса электронов в митохондриях. Тестируемые соединения (олигомицин, FCCP и смесь ротенона и антимицина A, описанные ниже) последовательно вводят для измерения продуцирования АТФ, максимального дыхания и немитохондриального дыхания соответственно. Затем с помощью этих параметров и базального дыхания рассчитывают утечку протонов и запасную дыхательную способность. Каждый модулятор нацелен на определенный компонент цепи переноса электронов. Олигомицин ингибирует АТФ-синтазу (комплекс V), а снижение OCR после инъекции олигомицина коррелирует с митохондриальным дыханием, связанным с клеточным продуцированием АТФ. Карбонилцианид-4 (трифторметокси)фенилгидразон (FCCP) представляет собой разобщающий агент, который разрушает протонный градиент и нарушает потенциал митохондриальной мембраны. В результате поток электронов по цепи переноса электронов не тормозится, а кислород максимально потребляется комплексом IV. Затем OCR, стимулированный FCCP, можно применять для расчета резервной дыхательной способности, определяемой как разница между максимальным дыханием и базальным дыханием. Запасная дыхательная способность (SRC) представляет собой меру способности клетки реагировать на увеличение потребности в энергии. Третья инъекция представляет собой смесь ротенона, ингибитора комплекса I, и антимицина A, ингибитора комплекса III. Указанная комбинация отключает митохондриальное дыхание и позволяет рассчитать немитохондриальное дыхание, вызванное процессами вне митохондрий. В некоторых вариантах осуществления сравнение проводится, например, со свежесобранными TIL и/или TIL, полученными способами, отличными от описанных в настоящем документе, включая, например, способы, отличные от представленных на фиг. 9.

В некоторых вариантах осуществления метаболический анализ представляет собой базальное дыхание. Как правило, TIL после второго размножения имеют частоту базального дыхания, которая составляет по меньшей мере 50%, по меньшей мере 55%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% частоты базального дыхания свежесобранных TIL и/или TIL, полученных способами, отличными от описанных в настоящем документе, включая, например, способы, отличные от представленных на фиг. 9. В некоторых вариантах осуществления скорость базального дыхания составляет от около 50% до около 99% скорости базального дыхания свежесобранных TIL и/или TIL, полученных способами, отличными от описанных в настоящем документе, включая, например, способы, отличные от представленных на фиг. 9. В некоторых вариантах осуществления скорость базального дыхания составляет от около 60% до около 99% скорости базального дыхания свежесобранных TIL и/или TIL, полученных способами, отличными от описанных в настоящем документе, включая, например, способы, отличные от представленных на фиг. 9. В некоторых вариантах осуществления скорость базального дыхания составляет от около 70% до около 99% скорости базального дыхания свежесобранных TIL и/или TIL, полученных способами, отличными от описанных в настоящем документе, включая, например, способы, отличные от представленных на фиг. 9. В некоторых вариантах осуществления скорость базального дыхания составляет от около 80% до около 99% скорости базального дыхания свежесобранных TIL и/или TIL, полученных способами, отличными от описанных в настоящем документе, включая, например, способы, отличные от представленных на фиг. 9. В некоторых вариантах осуществления скорость базального дыхания составляет от около 90% до около 99% скорости базального дыхания свежесобранных TIL и/или TIL, полученных способами, отличными от описанных в настоящем документе, включая, например, способы, отличные от представленных на фиг. 9. В некоторых вариантах осуществления скорость базального дыхания составляет от около 95% до около 99% скорости базального дыхания свежесобранных TIL и/или TIL, полученных способами, отличными от описанных в настоящем документе, включая, например, способы, отличные от представленных на фиг. 9. В некоторых вариантах осуществления TIL после второго размножения или TIL после второго дополнительного размножения (такие как, например, описанные на этапе D на фиг. 9, включая TIL, называемые reREP TIL) имеют частоту базального дыхания, которая статистически

значимо не отличается от частоты базального дыхания свежесобранных TIL и/или TIL, полученных способами, отличными от описанных в настоящем документе, включая, например, способы, отличные от представленных на фиг. 9. В некоторых вариантах осуществления сравнение проводится, например, со свежесобранными TIL и/или TIL, полученными способами, отличными от описанных в настоящем документе, включая, например, способы, отличные от представленных на фиг. 9.

В некоторых вариантах осуществления метаболический анализ представляет собой запасную дыхательную способность. Как правило, TIL после второго размножения или TIL после второго дополнительного размножения (такие как, например, описанные на этапе D на фиг. 9, включая TIL, называемые re-REP TIL) имеют запасную дыхательную способность, которая составляет по меньшей мере 50%, по меньшей мере 55%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% скорости базального дыхания свежесобранных TIL и/или TIL, полученных способами, отличными от описанных в настоящем документе, включая, например, способы, отличные от представленных на фиг. 9. В некоторых вариантах осуществления запасная дыхательная способность составляет от около 50% до около 99% скорости базального дыхания свежесобранных TIL. В некоторых вариантах осуществления запасная дыхательная способность составляет от около 50% до около 99% скорости базального дыхания свежесобранных TIL и/или TIL, полученных способами, отличными от описанных в настоящем документе, включая, например, способы, отличные от представленных на фиг. 9. В некоторых вариантах осуществления запасная дыхательная способность составляет от около 60% до около 99% скорости базального дыхания свежесобранных TIL и/или TIL, полученных способами, отличными от описанных в настоящем документе, включая, например, способы, отличные от представленных на фиг. 9. В некоторых вариантах осуществления запасная дыхательная способность составляет от около 70% до около 99% скорости базального дыхания свежесобранных TIL и/или TIL, полученных способами, отличными от описанных в настоящем документе, включая, например, способы, отличные от представленных на фиг. 9. В некоторых вариантах осуществления запасная дыхательная способность составляет от около 80% до около 99% скорости базального дыхания свежесобранных TIL. В некоторых вариантах осуществления запасная дыхательная способность составляет от около 90% до около 99% скорости базального дыхания свежесобранных TIL и/или TIL, полученных способами, отличными от описанных в настоящем документе, включая, например, способы, отличные от представленных на фиг. 9. В некоторых вариантах осуществления запасная дыхательная способность составляет от около 95% до около 99% скорости базального дыхания свежесобранных TIL и/или TIL, полученных способами, отличными от описанных в настоящем документе, включая, например, способы, отличные от представленных на фиг. 9. В некоторых вариантах осуществления TIL после второго размножения или TIL после второго дополнительного размножения (такие как, например, описанные на этапе D на фиг. 9, включая TIL, называемые reREP TIL) имеют запасную дыхательную способность, которая статистически значимо не отличается от частоты базального дыхания свежесобранных TIL и/или TIL, полученных способами, отличными от описанных в настоящем документе, включая, например, способы, отличные от представленных на фиг. 9.

Как правило, TIL после второго размножения или TIL после второго дополнительного размножения (такие как, например, описанные на этапе D на фиг. 9, включая TIL, называемые reREP TIL) имеют запасную дыхательную способность, которая составляет по меньшей мере 50%, по меньшей мере 55%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% скорости базального дыхания свежесобранных TIL и/или TIL, полученных способами, отличными от описанных в настоящем документе, включая, например, способы, отличные от представленных на фиг. 9. В некоторых вариантах осуществления измеряемый метаболический анализ представляет собой гликолитический резерв. В некоторых вариантах осуществления метаболический анализ представляет собой запасную дыхательную способность. Для измерения клеточного (респираторного) метаболизма клетки обрабатывали ингибиторами митохондриального дыхания и гликолиза для определения метаболического профиля TIL, состоящего из следующих показателей: исходное окислительное фосфорилирование (определяемое посредством OCR), запасная дыхательная способность, исходная гликолитическая активность (определяемая посредством ECAR) и гликолитический резерв. Метаболические профили получали с помощью комбинированного митохондриального/гликолизного стресс-теста Seahorse (включая набор, коммерчески доступный от Agilent®), который позволяет определять способность клеток осуществлять гликолиз при блокировании митохондриального продуцирования АТФ. В некоторых вариантах осуществления клетки подвергают голоданию по глюкозе, затем вводят глюкозу, а затем стресс-агент. В некоторых вариантах осуществления стресс-агент выбран из группы, состоящей из олигомицина, FCCP, ротенона, антимицина А и/или 2-дезоксиглюкозы (2-DG), а также их комбинаций. В некоторых вариантах осуществления олигомицин добавляют в количестве 10 мМ. В некоторых вариантах осуществления FCCP добавляют в количестве 10 мМ. В некоторых вариантах осуществления ротенон добавляют в количестве 2,5 мМ. В некоторых вариантах осуществления антимицин А добавляют в количестве 2,5 мМ. В некоторых вариантах осуществления 2-дезоксиглюкозу

(2-DG) добавляют в количестве 500 мМ. В некоторых вариантах осуществления измеряют гликолитическую емкость, гликолитический резерв и/или негликолитическое подкисление. Как правило, TIL имеют гликолитический резерв, который составляет по меньшей мере 50%, по меньшей мере 55%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% частоты базального дыхания свежесобранных TIL и/или TIL, полученных способами, отличными от описанных в настоящем документе, включая, например, способы, отличные от представленных на фиг. 9. В некоторых вариантах осуществления гликолитический резерв составляет от около 50% до около 99% скорости базального дыхания свежесобранных TIL и/или TIL, полученных способами, отличными от описанных в настоящем документе, включая, например, способы, отличные от представленных на фиг. 9. В некоторых вариантах осуществления гликолитический резерв составляет от около 60% до около 99% скорости базального дыхания свежесобранных TIL и/или TIL, полученных способами, отличными от описанных в настоящем документе, включая, например, способы, отличные от представленных на фиг. 9. В некоторых вариантах осуществления гликолитический резерв составляет от около 70% до около 99% скорости базального дыхания свежесобранных TIL и/или TIL, полученных способами, отличными от описанных в настоящем документе, включая, например, способы, отличные от представленных на фиг. 9. В некоторых вариантах осуществления гликолитический резерв составляет от около 80% до около 99% скорости базального дыхания свежесобранных TIL и/или TIL, полученных способами, отличными от описанных в настоящем документе, включая, например, способы, отличные от представленных на фиг. 9. В некоторых вариантах осуществления гликолитический резерв составляет от около 90% до около 99% скорости базального дыхания свежесобранных TIL и/или TIL, полученных способами, отличными от описанных в настоящем документе, включая, например, способы, отличные от представленных на фиг. 9. В некоторых вариантах осуществления гликолитический резерв составляет от около 95% до около 99% скорости базального дыхания свежесобранных TIL и/или TIL, полученных способами, отличными от описанных в настоящем документе, включая, например, способы, отличные от представленных на фиг. 9.

В некоторых вариантах осуществления метаболический анализ представляет собой базальный гликолиз. В некоторых вариантах осуществления TIL после второго размножения или TIL после второго дополнительного размножения (такие как, например, описанные на этапе D на фиг. 9, включая TIL, называемые reREP TIL) имеют увеличение базального гликолиза в по меньшей мере два раза, по меньшей мере три раза, по меньшей мере четыре раза, по меньшей мере пять раз, по меньшей мере шесть раз, по меньшей мере семь раз, в по меньшей мере семь раз, по меньшей мере девять раз, по меньшей мере десять раз в сравнении со свежесобранными TIL и/или TIL, полученными способами, отличными от описанных в настоящем документе, включая, например, способы, отличные от представленных на фиг. 9. В некоторых вариантах осуществления TIL после второго размножения или TIL после второго дополнительного размножения (такие как, например, описанные на этапе D на фиг. 9, включая TIL, называемые reREP TIL) имеют увеличение базального гликолиза от около двух до около десяти раз в сравнении со свежесобранными TIL и/или TIL, полученными способами, отличными от описанных в настоящем документе, включая, например, способы, отличные от представленных на фиг. 9. В некоторых вариантах осуществления TIL после второго размножения или TIL после второго дополнительного размножения (такие как, например, описанные на этапе D на фиг. 9, включая TIL, называемые reREP TIL) имеют увеличение базального гликолиза от около двух до около восьми раз в сравнении со свежесобранными TIL и/или TIL, полученными способами, отличными от описанных в настоящем документе, включая, например, способы, отличные от представленных на фиг. 9. В некоторых вариантах осуществления TIL после второго размножения или TIL после второго дополнительного размножения (такие как, например, описанные на этапе D на фиг. 9, включая TIL, называемые reREP TIL) имеют увеличение базального гликолиза от около двух до около семи раз в сравнении со свежесобранными TIL и/или TIL, полученными способами, отличными от описанных в настоящем документе, включая, например, способы, отличные от представленных на фиг. 9. В некоторых вариантах осуществления TIL после второго размножения или TIL после второго дополнительного размножения (такие как, например, описанные на этапе D на фиг. 9, включая TIL, называемые reREP TIL) имеют увеличение базального гликолиза от около двух до около четырех раз в сравнении со свежесобранными TIL и/или TIL, полученными способами, отличными от описанных в настоящем документе, включая, например, способы, отличные от представленных на фиг. 9. В некоторых вариантах осуществления TIL после второго размножения или TIL после второго дополнительного размножения (такие как, например, описанные на этапе D на фиг. 9, включая TIL, называемые reREP TIL) имеют увеличение базального гликолиза от около двух до около трех раз в сравнении со свежесобранными TIL и/или TIL, полученными способами, отличными от описанных в настоящем документе, включая, например, способы, отличные от представленных на фиг. 9.

Как правило, TIL после второго размножения или TIL после второго дополнительного размножения (такие как, например, описанные на этапе D на фиг. 9, включая TIL, называемые reREP TIL) имеют гликолитический резерв, который составляет по меньшей мере 50%, по меньшей мере 55%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по

меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% скорости базального дыхания свежесобранных TIL и/или TIL, полученных способами, отличными от описанных в настоящем документе, включая, например, способы, отличные от представленных на фиг. 9. В некоторых вариантах осуществления гликолитический резерв составляет от около 50% до около 99% скорости базального дыхания свежесобранных TIL. В некоторых вариантах осуществления гликолитический резерв составляет от около 60% до около 99% скорости базального дыхания свежесобранных TIL и/или TIL, полученных способами, отличными от описанных в настоящем документе, включая, например, способы, отличные от представленных на фиг. 9. В некоторых вариантах осуществления гликолитический резерв составляет от около 70% до около 99% скорости базального дыхания свежесобранных TIL и/или TIL, полученных способами, отличными от описанных в настоящем документе, включая, например, способы, отличные от представленных на фиг. 9. В некоторых вариантах осуществления гликолитический резерв составляет от около 80% до около 99% скорости базального дыхания свежесобранных TIL и/или TIL, полученных способами, отличными от описанных в настоящем документе, включая, например, способы, отличные от представленных на фиг. 9. В некоторых вариантах осуществления гликолитический резерв составляет от около 90% до около 99% скорости базального дыхания свежесобранных TIL и/или TIL, полученных способами, отличными от описанных в настоящем документе, включая, например, способы, отличные от представленных на фиг. 9. В некоторых вариантах осуществления гликолитический резерв составляет от около 95% до около 99% скорости базального дыхания свежесобранных TIL.

Продуцирование гранзима B. Гранзим B представляет собой еще один показатель способности TIL убивать клетки-мишени. Супернатанты среды, повторно стимулированные, как описано выше, с помощью антител к CD3, CD28 и CD137/4-1BB, также оценивали на содержание гранзима B с помощью набора для ELISA Human Granzyme B DuoSet (R & D Systems, Миннеаполис, штат Миннесота) в соответствии с инструкцией производителя. В некоторых вариантах осуществления TIL после второго размножения или TIL после второго дополнительного размножения (такие как, например, описанные на этапе D на фиг. 9, включая TIL, называемые reREP TIL) повышают продуцирование гранзима B. В некоторых вариантах осуществления TIL после второго размножения или TIL после второго дополнительного размножения (такие как, например, описанные на этапе D на фиг. 9, включая TIL, называемые reREP TIL) имеют повышенную цитотоксическую активность.

В некоторых вариантах осуществления длину теломер можно применять в качестве меры жизнеспособности клеток и/или клеточной функции. В некоторых вариантах осуществления теломеры, на удивление, имеют такую же длину в TIL, полученных способами по настоящему изобретению, в сравнении с TIL, полученными способами, отличными от описанных в настоящем документе, включая, например, способы, отличные от представленных на фиг. 9. Измерение длины теломер: были использованы различные способы для измерения длины теломер в геномной ДНК и цитологических препаратах. Анализ рестрикционных фрагментов теломер (TRF) является золотым стандартом измерения длины теломер (de Lange et al., 1990). Однако основным ограничением анализа TRF является необходимость большого количества ДНК (1,5 мкг). Два широко применяемых метода измерения длины теломер, а именно, флуоресценцию при in situ гибридизации (FISH; Agilent Technologies, Санта-Клара, штат Калифорния) и количественную ПЦР, можно применять с настоящим изобретением. В некоторых вариантах осуществления отсутствует изменение длины теломер между первоначально собранными TIL на этапе A и размноженными TIL, например, на этапе D, как показано на фиг. 9.

В некоторых вариантах осуществления TIL экспрессируют один или более маркеров, выбранных из группы, состоящей из гранзима B, перфорина и гранулизина. В некоторых вариантах осуществления TIL экспрессируют гранзим B. В некоторых вариантах осуществления TIL экспрессируют перфорин. В некоторых вариантах осуществления TIL экспрессируют гранулизин.

В одном варианте осуществления повторно стимулированные TIL также можно оценивать на высвобождение цитокинов с помощью анализов высвобождения цитокинов. В некоторых вариантах осуществления TIL можно оценивать на секрецию интерферона-γ (IFN-γ). В некоторых вариантах осуществления секрецию IFN-γ измеряют с помощью анализа ELISA. В некоторых вариантах осуществления секрецию IFN-γ измеряют с помощью анализа ELISA после этапа быстрого второго размножения, после этапа D, как показано, например, на фиг. 2 (в частности, например, на фиг. 2A и/или 2B, и/или 2C, и/или 9). В некоторых вариантах осуществления здоровье TIL измеряется секрецией гамма-интерферона (IFN-γ). В некоторых вариантах осуществления секреция IFN-γ является показателем наличия активных TIL. В некоторых вариантах осуществления применяют анализ эффективности, основанный на определении продуцирования IFN-γ. Продуцирование IFN-γ является еще одним показателем цитотоксического потенциала. Продуцирование IFN-γ можно измерять путем определения уровней цитокина IFN-γ в средах TIL, стимулированных антителами к CD3, CD28 и CD137/4-1BB. Уровни IFN-γ в средах из этих стимулированных TIL можно определить путем измерения высвобождения IFN-γ. В некоторых вариантах осуществления увеличение продуцирования IFN-γ, например, на этапе D в процессе Gen 3, как показано на фиг. 2 (в частности, например, фиг. 2A и/или 2B, и/или 2C, и/или 9) TIL по сравнению, например, с этапом D в

процессе 2A, как показано на фиг. 2 (в частности, например, фиг. 2A), указывает на увеличение цитотоксического потенциала TIL на этапе D. В некоторых вариантах осуществления секреция IFN-γ увеличивается в один раз, два раза, три раза, четыре раза или пять раз или более. В некоторых вариантах осуществления секреция IFN-γ увеличивается в один раз. В некоторых вариантах осуществления секреция IFN-γ увеличивается в два раза. В некоторых вариантах осуществления секреция IFN-γ увеличивается в три раза. В некоторых вариантах осуществления секреция IFN-γ увеличивается в четыре раза. В некоторых вариантах осуществления секреция IFN-γ увеличивается в пять раз. В некоторых вариантах осуществления уровень IFN-γ измеряют с помощью набора Quantikine ELISA. В некоторых вариантах осуществления уровень IFN-γ измеряют в TIL ex vivo. В некоторых вариантах осуществления уровень IFN-γ измеряют в TIL ex vivo, включая TIL, полученные способами по настоящему изобретению, включая, например, способы, представленные на фиг. 2B.

В некоторых вариантах осуществления TIL, способные к увеличению секреции IFN-γ в по меньшей мере один раз, два раза, три раза, четыре раза, пять раз или более, представляют собой TIL, полученные способами размножения по настоящему изобретению, включая, например, способы, представленные на фиг. 2A и/или 2B, и/или 2C, и/или 9. В некоторых вариантах осуществления TIL, способные к увеличению секреции IFN-γ в по меньшей мере один раз, представляют собой TIL, полученные способами размножения по настоящему изобретению, включая, например, способы, представленные на фиг. 2A и/или 2B, и/или 2C, и/или 9. В некоторых вариантах осуществления TIL, способные к увеличению секреции IFN-γ в по меньшей мере два раза, представляют собой TIL, полученные способами размножения по настоящему изобретению, включая, например, способы, представленные на фиг. 2A и/или 2B, и/или 2C, и/или 9. В некоторых вариантах осуществления TIL, способные к увеличению секреции IFN-γ в по меньшей мере три раза, представляют собой TIL, полученные способами размножения по настоящему изобретению, включая, например, способы, представленные на фиг. 2A и/или 2B, и/или 2C, и/или 9. В некоторых вариантах осуществления TIL, способные к увеличению секреции IFN-γ в по меньшей мере четыре раза, представляют собой TIL, полученные способами размножения по настоящему изобретению, включая, например, способы, представленные на фиг. 2A и/или 2B, и/или 2C, и/или 9. В некоторых вариантах осуществления TIL, способные к увеличению секреции IFN-γ в по меньшей мере пять раз, представляют собой TIL, полученные способами размножения по настоящему изобретению, включая, например, способы, представленные на фиг. 2A и/или 2B, и/или 2C, и/или 9.

В некоторых вариантах осуществления TIL, способные к секреции IFN-γ от по меньшей мере 100 пг/мл до около 1000 пг/мл или более, представляют собой TIL, полученные способами размножения по настоящему изобретению, включая, например, способы, представленные на фиг. 2A и/или 2B, и/или 2C, и/или 9. В некоторых вариантах осуществления TIL, способные к секреции IFN-γ по меньшей мере 200 пг/мл, по меньшей мере 250 пг/мл, по меньшей мере 300 пг/мл, по меньшей мере 350 пг/мл, по меньшей мере 400 пг/мл, по меньшей мере 450 пг/мл, при по меньшей мере 500 пг/мл, по меньшей мере 550 пг/мл, по меньшей мере 600 пг/мл, по меньшей мере 650 пг/мл, по меньшей мере 700 пг/мл, по меньшей мере 750 пг/мл, по меньшей мере 800 пг/мл, по меньшей мере 850 пг/мл, по меньшей мере 900 пг/мл, по меньшей мере 950 пг/мл или по меньшей мере 1000 пг/мл или более, представляют собой TIL, полученные способами размножения по настоящему изобретению, включая, например, способы, представленные на фиг. 2A и/или 2B, и/или 2C, и/или 9. В некоторых вариантах осуществления TIL, способные к секреции IFN-γ по меньшей мере 200 пг/мл, представляют собой TIL, полученные способами размножения по настоящему изобретению, включая, например, способы, представленные на фиг. 2A и/или 2B, и/или 2C, и/или 9. В некоторых вариантах осуществления TIL, способные к секреции IFN-γ по меньшей мере 200 пг/мл, представляют собой TIL, полученные способами размножения по настоящему изобретению, включая, например, способы, представленные на фиг. 2A и/или 2B, и/или 2C, и/или 9. В некоторых вариантах осуществления TIL, способные к секреции IFN-γ по меньшей мере 300 пг/мл, представляют собой TIL, полученные способами размножения по настоящему изобретению, включая, например, способы, представленные на фиг. 2A и/или 2B, и/или 2C, и/или 9. В некоторых вариантах осуществления TIL, способные к секреции IFN-γ по меньшей мере 400 пг/мл, представляют собой TIL, полученные способами размножения по настоящему изобретению, включая, например, способы, представленные на фиг. 2A и/или 2B, и/или 2C, и/или 9. В некоторых вариантах осуществления TIL, способные к секреции IFN-γ по меньшей мере 500 пг/мл, представляют собой TIL, полученные способами размножения по настоящему изобретению, включая, например, способы, представленные на фиг. 2A и/или 2B, и/или 2C, и/или 9. В некоторых вариантах осуществления TIL, способные к секреции IFN-γ по меньшей мере 600 пг/мл, представляют собой TIL, полученные способами размножения по настоящему изобретению, включая, например, способы, представленные на фиг. 2A и/или 2B, и/или 2C, и/или 9. В некоторых вариантах осуществления TIL, способные к секреции IFN-γ по меньшей мере 700 пг/мл, представляют собой TIL, полученные способами размножения по настоящему изобретению, включая, например, способы, представленные на фиг. 2A и/или 2B, и/или 2C, и/или 9. В некоторых вариантах осуществления TIL, способные к секреции IFN-γ по меньшей мере 800 пг/мл, представляют собой TIL, полученные способами

размножения по настоящему изобретению, включая, например, способы, представленные на фиг. 2A и/или 2B, и/или 2C, и/или 9. В некоторых вариантах осуществления TIL, способные к секреции IFN-γ по меньшей мере 900 пг/мл, представляют собой TIL, полученные способами размножения по настоящему изобретению, включая, например, способы, представленные на фиг. 2A и/или 2B, и/или 2C, и/или 9. В некоторых вариантах осуществления TIL, способные к секреции IFN-γ по меньшей мере 1000 пг/мл, представляют собой TIL, полученные способами размножения по настоящему изобретению, включая, например, способы, представленные на фиг. 2A и/или 2B, и/или 2C, и/или 9. В некоторых вариантах осуществления TIL, способные к секреции IFN-γ по меньшей мере 2000 пг/мл, представляют собой TIL, полученные способами размножения по настоящему изобретению, включая, например, способы, представленные на фиг. 2A и/или 2B, и/или 2C, и/или 9. В некоторых вариантах осуществления TIL, способные к секреции IFN-γ по меньшей мере 3000 пг/мл, представляют собой TIL, полученные способами размножения по настоящему изобретению, включая, например, способы, представленные на фиг. 2A и/или 2B, и/или 2C, и/или 9. В некоторых вариантах осуществления TIL, способные к секреции IFN-γ по меньшей мере 4000 пг/мл, представляют собой TIL, полученные способами размножения по настоящему изобретению, включая, например, способы, представленные на фиг. 2A и/или 2B, и/или 2C, и/или 9. В некоторых вариантах осуществления TIL, способные к секреции IFN-γ по меньшей мере 5000 пг/мл, представляют собой TIL, полученные способами размножения по настоящему изобретению, включая, например, способы, представленные на фиг. 2A и/или 2B, и/или 2C, и/или 9. В некоторых вариантах осуществления TIL, способные к секреции IFN-γ по меньшей мере 6000 пг/мл, представляют собой TIL, полученные способами размножения по настоящему изобретению, включая, например, способы, представленные на фиг. 2A и/или 2B, и/или 2C, и/или 9. В некоторых вариантах осуществления TIL, способные к секреции IFN-γ по меньшей мере 7000 пг/мл, представляют собой TIL, полученные способами размножения по настоящему изобретению, включая, например, способы, представленные на фиг. 2A и/или 2B, и/или 2C, и/или 9. В некоторых вариантах осуществления TIL, способные к секреции IFN-γ по меньшей мере 8000 пг/мл, представляют собой TIL, полученные способами размножения по настоящему изобретению, включая, например, способы, представленные на фиг. 2A и/или 2B, и/или 2C, и/или 9. В некоторых вариантах осуществления TIL, способные к секреции IFN-γ по меньшей мере 9000 пг/мл, представляют собой TIL, полученные способами размножения по настоящему изобретению, включая, например, способы, представленные на фиг. 2A и/или 2B, и/или 2C, и/или 9. В некоторых вариантах осуществления TIL, способные к секреции IFN-γ по меньшей мере 10000 пг/мл, представляют собой TIL, полученные способами размножения по настоящему изобретению, включая, например, способы, представленные на фиг. 2A и/или 2B, и/или 2C, и/или 9. В некоторых вариантах осуществления TIL, способные к секреции IFN-γ по меньшей мере 15000 пг/мл, представляют собой TIL, полученные способами размножения по настоящему изобретению, включая, например, способы, представленные на фиг. 2A и/или 2B, и/или 2C, и/или 9. В некоторых вариантах осуществления TIL, способные к секреции IFN-γ по меньшей мере 20000 пг/мл, представляют собой TIL, полученные способами размножения по настоящему изобретению, включая, например, способы, представленные на фиг. 2A и/или 2B, и/или 2C, и/или 9. В некоторых вариантах осуществления TIL, способные к секреции IFN-γ по меньшей мере 25000 пг/мл, представляют собой TIL, полученные способами размножения по настоящему изобретению, включая, например, способы, представленные на фиг. 2A и/или 2B, и/или 2C, и/или 9. В некоторых вариантах осуществления TIL, способные к секреции IFN-γ по меньшей мере 30000 пг/мл, представляют собой TIL, полученные способами размножения по настоящему изобретению, включая, например, способы, представленные на фиг. 2A и/или 2B, и/или 2C, и/или 9. В некоторых вариантах осуществления TIL, способные к секреции IFN-γ по меньшей мере 35000 пг/мл, представляют собой TIL, полученные способами размножения по настоящему изобретению, включая, например, способы, представленные на фиг. 2A и/или 2B, и/или 2C, и/или 9. В некоторых вариантах осуществления TIL, способные к секреции IFN-γ по меньшей мере 40000 пг/мл, представляют собой TIL, полученные способами размножения по настоящему изобретению, включая, например, способы, представленные на фиг. 2A и/или 2B, и/или 2C, и/или 9. В некоторых вариантах осуществления TIL, способные к секреции IFN-γ по меньшей мере 45000 пг/мл, представляют собой TIL, полученные способами размножения по настоящему изобретению, включая, например, способы, представленные на фиг. 2A и/или 2B, и/или 2C, и/или 9. В некоторых вариантах осуществления TIL, способные к секреции IFN-γ по меньшей мере 50000 пг/мл, представляют собой TIL, полученные способами размножения по настоящему изобретению, включая, например, способы, представленные на фиг. 2A и/или 2B, и/или 2C, и/или 9.

В некоторых вариантах осуществления TIL, способные к секреции IFN-γ от по меньшей мере 100 пг/мл/5e5 клеток до около 1000 пг/мл/5e5 клеток или более, представляют собой TIL, полученные способами размножения по настоящему изобретению, включая, например, способы, представленные на фиг. 2A и/или 2B, и/или 2C, и/или 9. В некоторых вариантах осуществления TIL, способные к секреции IFN-γ по меньшей мере 200 пг/мл/5e5 клеток, по меньшей мере 250 пг/мл/5e5 клеток, по меньшей мере 300 пг/мл/5e5 клеток, по меньшей мере 350 пг/мл/5e5 клеток, по меньшей мере 400 пг/мл/5e5 клеток, по

меньшей мере 450 пг/мл/5e5 клеток, по меньшей мере 500 пг/мл/5e5 клеток, по меньшей мере 550 пг/мл/5e5 клеток, по меньшей мере 600 пг/мл/5e5 клеток, по меньшей мере 650 пг/мл/5e5 клеток, по меньшей мере 700 пг/мл/5e5 клеток, по меньшей мере 750 пг/мл/5e5 клеток, по меньшей мере 800 пг/мл/5e5 клеток, по меньшей мере 850 пг/мл/5e5 клеток, по меньшей мере 900 пг/мл/5e5 клеток, по меньшей мере 950 пг/мл/5e5 клеток или по меньшей мере 1000 пг/мл/5e5 клеток или более, представляют собой TIL, полученные способами размножения по настоящему изобретению, включая, например, способы, представленные на фиг. 2A и/или 2B, и/или 2C, и/или 9. В некоторых вариантах осуществления TIL, способные к секреции IFN-γ по меньшей мере 200 пг/мл/5e5 клеток, представляют собой TIL, полученные способами размножения по настоящему изобретению, включая, например, способы, представленные на фиг. 2A и/или 2B, и/или 2C, и/или 9. В некоторых вариантах осуществления TIL, способные к секреции IFN-γ по меньшей мере 200 пг/мл/5e5 клеток, представляют собой TIL, полученные способами размножения по настоящему изобретению, включая, например, способы, представленные на фиг. 2A и/или 2B, и/или 2C, и/или 9. В некоторых вариантах осуществления TIL, способные к секреции IFN-γ по меньшей мере 300 пг/мл/5e5 клеток, представляют собой TIL, полученные способами размножения по настоящему изобретению, включая, например, способы, представленные на фиг. 2A и/или 2B, и/или 2C, и/или 9. В некоторых вариантах осуществления TIL, способные к секреции IFN-γ по меньшей мере 400 пг/мл/5e5 клеток, представляют собой TIL, полученные способами размножения по настоящему изобретению, включая, например, способы, представленные на фиг. 2A и/или 2B, и/или 2C, и/или 9. В некоторых вариантах осуществления TIL, способные к секреции IFN-γ по меньшей мере 500 пг/мл/5e5 клеток, представляют собой TIL, полученные способами размножения по настоящему изобретению, включая, например, способы, представленные на фиг. 2A и/или 2B, и/или 2C, и/или 9. В некоторых вариантах осуществления TIL, способные к секреции IFN-γ по меньшей мере 600 пг/мл/5e5 клеток, представляют собой TIL, полученные способами размножения по настоящему изобретению, включая, например, способы, представленные на фиг. 2A и/или 2B, и/или 2C, и/или 9. В некоторых вариантах осуществления TIL, способные к секреции IFN-γ по меньшей мере 700 пг/мл/5e5 клеток, представляют собой TIL, полученные способами размножения по настоящему изобретению, включая, например, способы, представленные на фиг. 2A и/или 2B, и/или 2C, и/или 9. В некоторых вариантах осуществления TIL, способные к секреции IFN-γ по меньшей мере 800 пг/мл/5e5 клеток, представляют собой TIL, полученные способами размножения по настоящему изобретению, включая, например, способы, представленные на фиг. 2A и/или 2B, и/или 2C, и/или 9. В некоторых вариантах осуществления TIL, способные к секреции IFN-γ по меньшей мере 900 пг/мл/5e5 клеток, представляют собой TIL, полученные способами размножения по настоящему изобретению, включая, например, способы, представленные на фиг. 2A и/или 2B, и/или 2C, и/или 9. В некоторых вариантах осуществления TIL, способные к секреции IFN-γ по меньшей мере 1000 пг/мл/5e5 клеток, представляют собой TIL, полученные способами размножения по настоящему изобретению, включая, например, способы, представленные на фиг. 2A и/или 2B, и/или 2C, и/или 9. В некоторых вариантах осуществления TIL, способные к секреции IFN-γ по меньшей мере 2000 пг/мл/5e5 клеток, представляют собой TIL, полученные способами размножения по настоящему изобретению, включая, например, способы, представленные на фиг. 2A и/или 2B, и/или 2C, и/или 9. В некоторых вариантах осуществления TIL, способные к секреции IFN-γ по меньшей мере 3000 пг/мл/5e5 клеток, представляют собой TIL, полученные способами размножения по настоящему изобретению, включая, например, способы, представленные на фиг. 2A и/или 2B, и/или 2C, и/или 9. В некоторых вариантах осуществления TIL, способные к секреции IFN-γ по меньшей мере 4000 пг/мл/5e5 клеток, представляют собой TIL, полученные способами размножения по настоящему изобретению, включая, например, способы, представленные на фиг. 2A и/или 2B, и/или 2C, и/или 9. В некоторых вариантах осуществления TIL, способные к секреции IFN-γ по меньшей мере 5000 пг/мл/5e5 клеток, представляют собой TIL, полученные способами размножения по настоящему изобретению, включая, например, способы, представленные на фиг. 2A и/или 2B, и/или 2C, и/или 9. В некоторых вариантах осуществления TIL, способные к секреции IFN-γ по меньшей мере 6000 пг/мл/5e5 клеток, представляют собой TIL, полученные способами размножения по настоящему изобретению, включая, например, способы, представленные на фиг. 2A и/или 2B, и/или 2C, и/или 9. В некоторых вариантах осуществления TIL, способные к секреции IFN-γ по меньшей мере 7000 пг/мл/5e5 клеток, представляют собой TIL, полученные способами размножения по настоящему изобретению, включая, например, способы, представленные на фиг. 2A и/или 2B, и/или 2C, и/или 9. В некоторых вариантах осуществления TIL, способные к секреции IFN-γ по меньшей мере 8000 пг/мл/5e5 клеток, представляют собой TIL, полученные способами размножения по настоящему изобретению, включая, например, способы, представленные на фиг. 2A и/или 2B, и/или 2C, и/или 9. В некоторых вариантах осуществления TIL, способные к секреции IFN-γ по меньшей мере 9000 пг/мл/5e5 клеток, представляют собой TIL, полученные способами размножения по настоящему изобретению, включая, например, способы, представленные на фиг. 2A и/или 2B, и/или 2C, и/или 9. В некоторых вариантах осуществления TIL, способные к секреции IFN-γ по меньшей мере 10000 пг/мл/5e5 клеток, представляют собой TIL, полученные способами размножения по настоящему изобретению, включая, например, способы, представ-

ленные на фиг. 2A и/или 2B, и/или 2C, и/или 9. В некоторых вариантах осуществления TIL, способные к секреции IFN-γ по меньшей мере 15000 пг/мл/5e5 клеток, представляют собой TIL, полученные способами размножения по настоящему изобретению, включая, например, способы, представленные на фиг. 2A и/или 2B, и/или 2C, и/или 9. В некоторых вариантах осуществления TIL, способные к секреции IFN-γ по меньшей мере 20000 пг/мл/5e5 клеток, представляют собой TIL, полученные способами размножения по настоящему изобретению, включая, например, способы, представленные на фиг. 2A и/или 2B, и/или 2C, и/или 9. В некоторых вариантах осуществления TIL, способные к секреции IFN-γ по меньшей мере 25000 пг/мл/5e5 клеток, представляют собой TIL, полученные способами размножения по настоящему изобретению, включая, например, способы, представленные на фиг. 2A и/или 2B, и/или 2C, и/или 9. В некоторых вариантах осуществления TIL, способные к секреции IFN-γ по меньшей мере 30000 пг/мл/5e5 клеток, представляют собой TIL, полученные способами размножения по настоящему изобретению, включая, например, способы, представленные на фиг. 2A и/или 2B, и/или 2C, и/или 9. В некоторых вариантах осуществления TIL, способные к секреции IFN-γ по меньшей мере 35000 пг/мл/5e5 клеток, представляют собой TIL, полученные способами размножения по настоящему изобретению, включая, например, способы, представленные на фиг. 2A и/или 2B, и/или 2C, и/или 9. В некоторых вариантах осуществления TIL, способные к секреции IFN-γ по меньшей мере 40000 пг/мл/5e5 клеток, представляют собой TIL, полученные способами размножения по настоящему изобретению, включая, например, способы, представленные на фиг. 2A и/или 2B, и/или 2C, и/или 9. В некоторых вариантах осуществления TIL, способные к секреции IFN-γ по меньшей мере 45000 пг/мл/5e5 клеток, представляют собой TIL, полученные способами размножения по настоящему изобретению, включая, например, способы, представленные на фиг. 2A и/или 2B, и/или 2C, и/или 9. В некоторых вариантах осуществления TIL, способные к секреции IFN-γ по меньшей мере 50000 пг/мл/5e5 клеток, представляют собой TIL, полученные способами размножения по настоящему изобретению, включая, например, способы, представленные на фиг. 2A и/или 2B, и/или 2C, и/или 9.

В некоторых вариантах осуществления TIL, способные к понижению уровня секреции TNF-α (т.е. TNF-альфа) в по меньшей мере один раз, два раза, три раза, четыре раза, пять раз или более в сравнении с секрецией IFN-γ, представляют собой TIL, полученные способами размножения по настоящему изобретению, включая, например, способы, представленные на фиг. 2A и/или 2B, и/или 2C, и/или 9. В некоторых вариантах осуществления TIL, способные к понижению уровня секреции TNF-α в сравнении с секрецией IFN-γ в по меньшей мере один раз, представляют собой TIL, полученные способами размножения по настоящему изобретению, включая, например, способы, представленные на фиг. 2A и/или 2B, и/или 2C, и/или 9. В некоторых вариантах осуществления TIL, способные к понижению уровня секреции TNF-α в сравнении с секрецией IFN-γ в по меньшей мере два раза, представляют собой TIL, полученные способами размножения по настоящему изобретению, включая, например, способы, представленные на фиг. 2A и/или 2B, и/или 2C, и/или 9. В некоторых вариантах осуществления TIL, способные к понижению уровня секреции TNF-α в сравнении с секрецией IFN-γ в по меньшей мере три раза, представляют собой TIL, полученные способами размножения по настоящему изобретению, включая, например, способы, представленные на фиг. 2A и/или 2B, и/или 2C, и/или 9. В некоторых вариантах осуществления TIL, способные к понижению уровня секреции TNF-α в сравнении с секрецией IFN-γ в по меньшей мере четыре раза, представляют собой TIL, полученные способами размножения по настоящему изобретению, включая, например, способы, представленные на фиг. 2A и/или 2B, и/или 2C, и/или 9. В некоторых вариантах осуществления TIL, способные к понижению уровня секреции TNF-α в сравнении с секрецией IFN-γ в по меньшей мере пять раз, представляют собой TIL, полученные способами размножения по настоящему изобретению, включая, например, способы, представленные на фиг. 2A и/или 2B, и/или 2C, и/или 9.

В некоторых вариантах осуществления TIL, способные к секреции TNF-α (т.е. TNF-альфа) от по меньшей мере 200 пг/мл/5e5 клеток до около 10000 пг/мл/5e5 клеток или более, представляют собой TIL, полученные способами размножения по настоящему изобретению, включая, например, способы, представленные на фиг. 2A и/или 2B, и/или 2C, и/или 9. В некоторых вариантах осуществления TIL, способные к секреции TNF-α от по меньшей мере 500 пг/мл/5e5 клеток до около 10000 пг/мл/5e5 клеток или более, представляют собой TIL, полученные способами размножения по настоящему изобретению, включая, например, способы, представленные на фиг. 2A и/или 2B, и/или 2C, и/или 9. В некоторых вариантах осуществления TIL, способные к секреции TNF-α от по меньшей мере 1000 пг/мл/5e5 клеток до около 10000 пг/мл/5e5 клеток или более, представляют собой TIL, полученные способами размножения по настоящему изобретению, включая, например, способы, представленные на фиг. 2A и/или 2B, и/или 2C, и/или 9. В некоторых вариантах осуществления TIL, способные к секреции TNF-α от по меньшей мере 2000 пг/мл/5e5 клеток до около 10000 пг/мл/5e5 клеток или более, представляют собой TIL, полученные способами размножения по настоящему изобретению, включая, например, способы, представленные на фиг. 2A и/или 2B, и/или 2C, и/или 9. В некоторых вариантах осуществления TIL, способные к секреции TNF-α от по меньшей мере 3000 пг/мл/5e5 клеток до около 10000 пг/мл/5e5 клеток или более, представляют собой TIL, полученные способами размножения по настоящему изобретению, включая,

например, способы, представленные на фиг. 2A и/или 2B, и/или 2C, и/или 9. В некоторых вариантах осуществления TIL, способные к секреции TNF-α от по меньшей мере 4000 пг/мл/5e5 клеток до около 10000 пг/мл/5e5 клеток или более, представляют собой TIL, полученные способами размножения по настоящему изобретению, включая, например, способы, представленные на фиг. 2A и/или 2B, и/или 2C, и/или 9. В некоторых вариантах осуществления TIL, способные к секреции TNF-α от по меньшей мере 5000 пг/мл/5e5 клеток до около 10000 пг/мл/5e5 клеток или более, представляют собой TIL, полученные способами размножения по настоящему изобретению, включая, например, способы, представленные на фиг. 2A и/или 2B, и/или 2C, и/или 9. В некоторых вариантах осуществления TIL, способные к секреции TNF-α от по меньшей мере 6000 пг/мл/5e5 клеток до около 10000 пг/мл/5e5 клеток или более, представляют собой TIL, полученные способами размножения по настоящему изобретению, включая, например, способы, представленные на фиг. 2A и/или 2B, и/или 2C, и/или 9. В некоторых вариантах осуществления TIL, способные к секреции TNF-α от по меньшей мере 7000 пг/мл/5e5 клеток до около 10000 пг/мл/5e5 клеток или более, представляют собой TIL, полученные способами размножения по настоящему изобретению, включая, например, способы, представленные на фиг. 2A и/или 2B, и/или 2C, и/или 9. В некоторых вариантах осуществления TIL, способные к секреции TNF-α от по меньшей мере 8000 пг/мл/5e5 клеток до около 10000 пг/мл/5e5 клеток или более, представляют собой TIL, полученные способами размножения по настоящему изобретению, включая, например, способы, представленные на фиг. 2A и/или 2B, и/или 2C, и/или 9. В некоторых вариантах осуществления TIL, способные к секреции TNF-α от по меньшей мере 9000 пг/мл/5e5 клеток до около 10000 пг/мл/5e5 клеток или более, представляют собой TIL, полученные способами размножения по настоящему изобретению, включая, например, способы, представленные на фиг. 2A и/или 2B, и/или 2C, и/или 9.

В некоторых вариантах осуществления измеряют уровни IFN-γ и гранзима B для определения фенотипических характеристик TIL, полученных способами размножения по настоящему изобретению, включая, например, способы, представленные на фиг. 2A и/или 2B, и/или 2C, и/или 9. В некоторых вариантах осуществления измеряют уровни IFN-γ и TNF-α для определения фенотипических характеристик TIL, полученных способами размножения по настоящему изобретению, включая, например, способы, представленные на фиг. 2A и/или 2B, и/или 2C, и/или 9. В некоторых вариантах осуществления измеряют уровни гранзима B и TNF-α для определения фенотипических характеристик TIL, полученных способами размножения по настоящему изобретению, включая, например, способы, представленные на фиг. 2A и/или 2B, и/или 2C, и/или 9. В некоторых вариантах осуществления измеряют уровни IFN-γ, гранзима B и TNF-α для определения фенотипических характеристик TIL, полученных способами размножения по настоящему изобретению, включая, например, способы, представленные на фиг. 2A и/или 2B, и/или 2C, и/или 9.

В некоторых вариантах осуществления цитотоксический потенциал TIL в отношении лизиса клеток-мишеней оценивали с помощью анализа совместного культивирования TIL с биолюминесцентной клеточной линией P815 (клон G6) в соответствии с анализом биолюминесцентного перенаправленного лизиса (анализ активности) для анализа TIL, который измеряет цитотоксичность TIL высокочувствительным дозозависимым образом.

В некоторых вариантах осуществления настоящие способы обеспечивают анализ для оценки жизнеспособности TIL способами, описанными выше. В некоторых вариантах осуществления TIL размножают, как описано выше, включая, например, как показано на фиг. 9. В некоторых вариантах осуществления TIL подвергают криоконсервации до оценки их жизнеспособности. В некоторых вариантах осуществления оценка жизнеспособности включает размораживание TIL до выполнения первого размножения, второго размножения и дополнительного второго размножения. В некоторых вариантах осуществления настоящие способы обеспечивают анализ для оценки клеточной пролиферации, клеточной токсичности, гибели клеток и/или других условий, связанных с жизнеспособностью популяции TIL. Жизнеспособность можно измерить с помощью любого из описанных выше метаболических анализов TIL, а также любых известных в данной области техники способов оценки жизнеспособности клеток. В некоторых вариантах осуществления настоящие способы обеспечивают анализ для оценки клеточной пролиферации, клеточной токсичности, гибели клеток и/или других условий, связанных с жизнеспособностью TIL, размноженных способами, описанными в настоящем документе, в том числе способами, представленными на фиг. 9.

В настоящем изобретении также предлагаются способы анализа для определения жизнеспособности TIL. В некоторых вариантах осуществления TIL обладают равной жизнеспособностью в сравнении со свежесобранными TIL и/или TIL, полученными способами, отличными от описанных в настоящем документе, включая, например, способы, отличные от представленных на фиг. 9. В некоторых вариантах осуществления TIL обладают повышенной жизнеспособностью в сравнении со свежесобранными TIL и/или TIL, полученными способами, отличными от описанных в настоящем документе, включая, например, способы, отличные от представленных на фиг. 9. В настоящем изобретении предлагаются способы анализа TIL на жизнеспособность путем размножения инфильтрирующих опухоль лимфоцитов (TIL) в более крупную популяцию TIL, включающие:

(i) получение первой популяции TIL, которая была предварительно размножена;

(ii) выполнение первого размножения путем культивирования первой популяции TIL в культуральной среде для клеток, содержащей IL-2, с получением второй популяции TIL;

(iii) выполнение второго размножения путем добавления в культуральную среду для клеток второй популяции TIL дополнительных IL-2, OKT-3 и антигенпрезентирующих клеток (APC) с получением третьей популяции TIL, причем третья популяция TIL по меньшей мере в 100 раз больше второй популяции TIL, и причем второе размножение выполняют в течение по меньшей мере 14 дней для получения третьей популяции TIL, причем третья популяция TIL включает увеличенную субпопуляцию эффекторных Т-клеток и/или центральных Т-клеток памяти относительно второй популяции TIL, и причем третью популяцию дополнительно анализируют на жизнеспособность.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения способ дополнительно включает в себя:

(iv) выполнение дополнительного второго размножения путем добавления в культуральную среду для клеток третьей популяции TIL дополнительного IL-2, дополнительного OKT-3 и дополнительных APC, причем дополнительное второе размножение выполняют в течение по меньшей мере 14 дней с получением большей популяции TIL, чем полученная на этапе (iii), причем большая популяция TIL включает увеличенную субпопуляцию эффекторных Т-клеток и/или центральных Т-клеток памяти в сравнении с третьей популяцией TIL, и причем третью популяцию дополнительно анализируют на жизнеспособность.

В некоторых вариантах осуществления до этапа (i) клетки подвергают криоконсервации.

В некоторых вариантах осуществления клетки размораживают до выполнения этапа (i).

В некоторых вариантах осуществления этап (iv) повторяют от одного до четырех раз, чтобы получить достаточное количество TIL для анализа.

В некоторых вариантах осуществления этапы (i)-(iii) или (iv) выполняют в течение периода от около 40 дней до около 50 дней.

В некоторых вариантах осуществления этапы (i)-(iii) или (iv) выполняют в течение периода от около 42 дней до около 48 дней.

В некоторых вариантах осуществления этапы (i)-(iii) или (iv) выполняют в течение периода от около 42 дней до около 45 дней.

В некоторых вариантах осуществления этапы (i)-(iii) или (iv) выполняют в течение около 44 дней.

В некоторых вариантах осуществления клетки с этапов (iii) или (iv) экспрессируют CD4, CD8 и TCR $\alpha\beta$ на уровнях, аналогичных свежесобранным клеткам.

В некоторых вариантах осуществления антигенпрезентирующие клетки представляют собой мононуклеарные клетки периферической крови (PBMC).

В некоторых вариантах осуществления PBMC добавляют в клеточную культуру в любой из дней с 9 по 17 на этапе (iii).

В некоторых вариантах осуществления эффекторные Т-клетки и/или центральные Т-клетки памяти в большей популяции TIL на этапе (iv) демонстрируют одну или более характеристик, выбранных из группы, состоящей из экспрессии CD27, экспрессии CD28, более длинных теломер, повышенной экспрессии CD57 и сниженной экспрессии CD56 в сравнении с эффекторными Т-клетками и/или центральными Т-клетками памяти в третьей популяции клеток.

В некоторых вариантах осуществления эффекторные Т-клетки и/или центральные Т-клетки памяти демонстрируют повышенную экспрессию CD57 и пониженную экспрессию CD56.

В некоторых вариантах осуществления APC представляют собой искусственные APC (aAPC).

В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает этап трансдукции первой популяции TIL вектором экспрессии, включающим нуклеиновую кислоту, кодирующую высокоаффинный Т-клеточный рецептор.

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

В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает этап трансдукции первой популяции TIL вектором экспрессии, включающим нуклеиновую кислоту, кодирующую химерный антигенный рецептор (CAR), содержащий антитело с одноцепочечным вариабельным фрагментом, слитое с по меньшей мере одним эндодоменом Т-клеточной сигнальной молекулы.

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

В некоторых вариантах осуществления TIL анализируют на жизнеспособность.

В некоторых вариантах осуществления TIL анализируют на жизнеспособность после криоконсервации.

В некоторых вариантах осуществления TIL анализируют на жизнеспособность после криоконсервации и после этапа (iv).

Разнообразные антигенные рецепторы Т- и В-лимфоцитов образуются в результате соматической рекомбинации ограниченного, но большого числа генных сегментов. Указанные генные сегменты включают: V (вариабельность), D (разнообразие), J (присоединение) и C (константа) определяют специфичность связывания и последующие применения иммуноглобулинов и Т-клеточных рецепторов (TCR). На-

стоящее изобретение обеспечивает способ создания TIL, которые демонстрируют и увеличивают разнообразие репертуара Т-клеток (иногда называемое поликлональностью). В некоторых вариантах осуществления увеличение разнообразия репертуара Т-клеток происходит в сравнении со свежесобранными TIL и/или TIL, полученными способами, отличными от описанных в настоящем документе, включая, например, способы, отличные от представленных на фиг. 9. В некоторых вариантах осуществления TIL, полученные настоящим способом, демонстрируют увеличение разнообразия репертуара Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления TIL, 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 присутствует в тяжелой цепи иммуноглобулина. В некоторых вариантах осуществления разнообразие иммуноглобулина присутствует в легкой цепи иммуноглобулина. В некоторых вариантах осуществления разнообразие присутствует 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. TCRα/β).

Согласно настоящему изобретению предложен способ анализа TIL на жизнеспособность и/или дальнейшее применение при введении субъекту. В некоторых вариантах осуществления способ анализа инфильтрирующих опухоль лимфоцитов (TIL) включает:

(i) получение первой популяции TIL;

(ii) выполнение первого размножения путем культивирования первой популяции TIL в культуральной среде для клеток, содержащей IL-2, с получением второй популяции TIL;

(iii) выполнение второго размножения путем добавления в культуральную среду для клеток второй популяции TIL дополнительных IL-2, OKT-3 и антигенпрезентирующих клеток (APC) с получением третьей популяции TIL, причем третья популяция TIL в по меньшей мере 50 раз больше второй популяции TIL;

(iv) сбор, промывание и криоконсервацию третьей популяции TIL;

(v) хранение криоконсервированных TIL при криогенной температуре;

(vi) размораживание третьей популяции TIL с получением размороженной третьей популяции TIL;

(vii) выполнение дополнительного второго размножения части размороженной третьей популяции TIL путем добавления в культуральную среду для клеток третьей популяции IL-2, OKT-3 и APC в течение дополнительного периода размножения (иногда называемого периодом reREP), составляющего по меньшей мере 3 дня, причем третье размножение выполняют для получения четвертой популяции TIL, причем количество TIL в четвертой популяции TIL сравнивают с количеством TIL в третьей популяции TIL для получения соотношения;

(viii) определение на основе соотношения, полученного на этапе (vii), пригодности размороженной популяции TIL для введения пациенту;

(ix) введение пациенту терапевтически эффективной дозы размороженной третьей популяции TIL, когда определено, что отношение количества TIL в четвертой популяции TIL к количеству TIL в третьей популяции TIL превышает 5:1 на этапе (viii).

В некоторых вариантах осуществления дополнительный период размножения (иногда называемый периодом reREP) выполняют до тех пор, пока отношение количества TIL в четвертой популяции TIL к количеству TIL в третьей популяции TIL не составит более 50:1.

В некоторых вариантах осуществления количество TIL, достаточное для терапевтически эффективной дозы, составляет от около $2,3 \times 10^{10}$ до около $13,7 \times 10^{10}$.

В некоторых вариантах осуществления этапы (i)-(vii) выполняют в течение периода от около 40 дней до около 50 дней. В некоторых вариантах осуществления этапы (i)-(vii) выполняют в течение периода от около 42 дней до около 48 дней. В некоторых вариантах осуществления этапы (i)-(vii) выполняют в течение периода от около 42 дней до около 45 дней. В некоторых вариантах осуществления этапы (i)-(vii) выполняют в течение около 44 дней.

В некоторых вариантах осуществления клетки с этапов (iii) или (vii) экспрессируют CD4, CD8 и TCR $\alpha\beta$ на уровнях, аналогичных свежесобранным клеткам. В некоторых вариантах осуществления клетки представляют собой TIL.

В некоторых вариантах осуществления антигенпрезентирующие клетки представляют собой мононуклеарные клетки периферической крови (PBMC). В некоторых вариантах осуществления PBMC добавляют в клеточную культуру в любой из дней с 9 по 17 на этапе (iii).

В некоторых вариантах осуществления эффекторные Т-клетки и/или центральные Т-клетки памяти в большей популяции TIL на этапах (iii) или (vii) демонстрируют одну или более характеристик, выбран-

ных из группы, состоящей из экспрессии CD27, экспрессии CD28, более длинных теломер, повышенной экспрессии CD57 и сниженной экспрессии CD56 в сравнении с эффекторными Т-клетками и/или центральными Т-клетками памяти в третьей популяции клеток.

В некоторых вариантах осуществления эффекторные Т-клетки и/или центральные Т-клетки памяти демонстрируют повышенную экспрессию CD57 и пониженную экспрессию CD56.

В некоторых вариантах осуществления APC представляют собой искусственные APC (aAPC).

В некоторых вариантах осуществления выполняют этап трансдукции первой популяции TIL вектором экспрессии, включающим нуклеиновую кислоту, кодирующую высокоаффинный Т-клеточный рецептор.

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

В некоторых вариантах осуществления выполняют этап трансдукции первой популяции TIL вектором экспрессии, включающим нуклеиновую кислоту, кодирующую химерный антигенный рецептор (CAR), содержащий антитело с одноцепочечным вариабельным фрагментом, слитое с по меньшей мере одним эндодоменом Т-клеточной сигнальной молекулы.

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

В некоторых вариантах осуществления TIL анализируют на жизнеспособность после этапа (vii).

В настоящем изобретении также предложены дополнительные способы анализа TIL. В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен способ анализа TIL, включающий:

(i) получение части первой популяции криоконсервированных TIL;

(ii) размораживание части первой популяции криоконсервированных TIL;

(iii) выполнение первого размножения путем культивирования части первой популяции TIL в культуральной среде для клеток, содержащей IL-2, OKT-3 и антигенпрезентирующие клетки (APC), в течение дополнительного периода размножения (иногда называемого периодом reREP), составляющего по меньшей мере 3 дня, с получением второй популяции TIL, причем часть первой популяции TIL сравнивают со второй популяцией TIL с получением соотношения количества TIL, причем отношение количества TIL во второй популяции TIL к количеству TIL в части первой популяции TIL составляет более 5:1;

(iv) определение на основе соотношения, полученного на этапе (iii), пригодности первой популяции TIL для применения при терапевтическом введении пациенту;

(v) определение пригодности первой популяции TIL для применения при терапевтическом введении, когда определено, что отношение количества TIL во второй популяции TIL к количеству TIL в первой популяции TIL составляет более 5:1 на этапе (iv).

В некоторых вариантах осуществления отношение количества TIL во второй популяции TIL к количеству TIL в части первой популяции TIL составляет более 50:1.

В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает выполнение размножения всей первой популяции криоконсервированных TIL с этапа (i) в соответствии со способами, описанными в любом из вариантов осуществления, представленных в настоящем документе.

В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает введение пациенту всей первой популяции криоконсервированных TIL с этапа (i).

K. Закрытые системы для производства TIL

Настоящее изобретение относится к применению закрытых систем в процессе культивирования TIL. Такие закрытые системы позволяют предотвращать и/или уменьшать микробное загрязнение, позволяют использовать меньшее количество колб и позволяют снижать затраты В некоторых вариантах осуществления в закрытой системе применяют два контейнера.

Такие закрытые системы хорошо известны в данной области техники и их описание можно найти, например, на сайтах http://www.fda.gov/cber/guidelines.htm и https://www.fda.gov/ BiologicsBloodVaccines/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/Blood/ucm076779.htm.

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

Введение.

Стерильные соединительные устройства (STCD) создают стерильные сварные швы между двумя частями совместимых труб. Эта процедура позволяет стерильно соединять контейнеры и трубы разного диаметра. В данном руководстве описаны рекомендуемые методы и процедуры для применения этих устройств. Данное руководство не касается информации о данных, которые производитель стерильного соединительного устройства должен представить в FDA для получения одобрения или разрешения на продажу. Важно также отметить, что применение одобренного или разрешенного для продажи стерильного соединительного устройства для целей, не указанных в информационном листке, может приводить к тому, что устройство будет считаться фальсифицированным и неправильно маркированным в соответствии с Федеральным Законом о пищевых продуктах, лекарственных средствах и парфюмерно-косметических товарах.

1. Рекомендации FDA.

Производители препаратов крови, планирующие постоянно применять разрешенные FDA STCD, должны включать информацию о таком применении в стандартную операционную процедуру (SOP) для

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

2. Применение STCD.

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

Следующие комментарии приведены в качестве руководства по более распространенному применению STCD, разрешенных для применения или одобренных FDA.

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

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

Тромбоциты, полученные при плазмаферезе в открытой системе, должны иметь указанный срок годности 24 ч, а тромбоциты, полученные при плазмаферезе в функционально закрытой системе, должны иметь указанный срок годности пять дней (см. Revised Guideline for Collection of Platelets, Pheresis, October 7, 1988).

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

M. Применение STCD для подготовки компонентов.

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

Примеры

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

Соединение дополнительного раствора с единицей эритроцитарной массы.

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

Добавление третьего контейнера для хранения к комплекту для тромбофереза.

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

1. Применение STCD для объединения препаратов крови Соответствующее применение STCD для объединения тромбоцитов, полученных из цельной крови, может устранить потенциальное загрязнение от обычно используемых игл и портов. Объединение, выполненное непосредственно до переливания, является примером такого подходящего применения. Объединенные тромбоциты следует вводить не более чем через 4 ч после объединения (см. 21 CFR 606.122(1)(2)).

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

Такое объединение тромбоцитов представляет собой производство нового продукта.

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

2. Применение STCD для получения аликвот для педиатрического применения и разделенных единиц.

Педиатрические единицы и разделенные единицы для цельной крови, красных кровяных клеток и

свежезамороженной плазмы, полученные с помощью STCD, не будут рассматриваться как новый продукт, для которого требуется дополнение к заявке на лицензирование биопрепарата (BLA), при соблюдении следующих условий:

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

Этикетки должны быть представлены на рассмотрение и утверждение до распространения. Отметка должна быть в разделе для комментариев FDA Form 2567, Transmittal of Labels and Circulars.

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

Тромбоциты, изготовленные в соответствии с лицензией, должны содержать по меньшей мере $5,5\times10^{10}$ тромбоцитов (21 CFR 640.24 (c)). Тромбоциты, полученные при плазмаферезе в соответствии с лицензией, должны содержать по меньшей мере $3,0\times10^{11}$ тромбоцитов (см. Revised Guideline for the Collection of Platelets, Pheresis, October 7, 1988).

Процедуры, которых следует придерживаться в отношении применения STCD для подготовки разделенных продуктов из цельной крови, а также из плазмы и тромбоцитов, полученных с помощью процедур автоматизированного гемафереза, должны включать описания

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

минимального объема разделенной плазмы или препаратов цельной крови;

объема и концентрации тромбоцитов в разделенных продуктах тромбафереза;

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

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

Примечание. Способы маркировки аликвот должны быть четко указаны в процедуре ведения записей и должны быть достаточными для отслеживания и отозвания всех компонентов, в случае необходимости.

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

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

4. Применение STCD для подведения обрабатывающих растворов.

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

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

В некоторых случаях уменьшающие количество лейкоцитов фильтры исходно не установлены в системах для сбора цельной крови. Процедуры применения STCD для фильтрования до хранения должны соответствовать инструкциям производителя фильтра по его применению.

Уменьшение количества лейкоцитов перед выпуском является серьезным изменением производственного процесса. Таким образом, для новых продуктов с уменьшенным количеством лейкоцитов, получаемых с помощью STCD, производители должны подавать заявки, или дополнения к ранее одобренным заявкам, на лицензию для производства биопрепаратов (21 CFR 601.2) в FDA (21 CFR 601.12).

Применение STCD для извлечения из контейнеров с препаратами крови образцов для тестирования (например, применение STCD для получения образца тромбоцитов из контейнера с тромбоцитами или тромбоцитами, полученными при плазмаферезе, для перекрестного сопоставления).

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

6. Дополнительная информация из руководства FDA.

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

В некоторых вариантах осуществления в закрытой системе применяют один контейнер с момента получения фрагментов опухоли до того момента, когда TIL готовы для введения пациенту или криоконсервации. В некоторых вариантах осуществления, когда применяют два контейнера, первый контейнер представляет собой закрытый G-контейнер, и популяцию TIL центрифугируют и переносят в инфузионный пакет без открывания первого закрытого G-контейнера. В некоторых вариантах осуществления, когда применяют два контейнера, инфузионный мешок представляет собой HypoThermosol-содержащий инфузионный пакет. Закрытая система, или закрытая система для культивирования TIL, характеризуется тем, что после добавления образца опухоли и/или фрагментов опухоли система является герметично закрытой снаружи, образуя замкнутую среду, свободную от вторжения бактерий, грибков и/или любых других микробных загрязнений.

В некоторых вариантах осуществления степень уменьшения микробного загрязнения составляет от около 5% до около 100%. В некоторых вариантах осуществления степень уменьшения микробного загрязнения составляет от около 5% до около 95%. В некоторых вариантах осуществления степень уменьшения микробного загрязнения составляет от около 5% до около 90%. В некоторых вариантах осуществления степень уменьшения микробного загрязнения составляет от около 10% до около 90%. В некоторых вариантах осуществления степень уменьшения микробного загрязнения составляет от около 15% до около 85%. В некоторых вариантах осуществления степень уменьшения микробного загрязнения составляет около 5%, около 10%, около 15%, около 20%, около 25%, около 30%, около 35%, около 40%, около 45%, около 50%, около 55%, около 60%, около 65%, около 70%, около 75%, около 80%, около 85%, около 90%, около 95%, около 97%, около 98%, около 99% или около 100%.

Закрытая система позволяет TIL расти в отсутствие и/или при значительной степени уменьшения микробного загрязнения.

Кроме того, pH, парциальное давление диоксида углерода и кислорода в среде культивирования TIL варьируются в процессе культивирования клеток. Следовательно, даже несмотря на циркуляцию среды, подходящей для культивирования клеток, среду в закрытой системе все еще необходимо постоянно поддерживать в оптимальном состоянии для пролиферации TIL. Для этого желательно контролировать физические факторы pH, парциального давления диоксида углерода и парциального давления кислорода в культуральной жидкости закрытой системы при помощи датчика, сигнал, которого используют для управления газообменником, установленным на входе в систему культивирования, для корректировки в реальном времени парциального давления газа в закрытой системе в соответствии с изменениями в культуральной жидкости, с тем, чтобы оптимизировать среду для культивирования клеток. В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к закрытой системе для культивирования клеток, имеющей на входе в закрытую систему газообменник, оборудованный контрольным устройством, которое измеряет pH, парциальное давление диоксида углерода и парциальное давление кислорода закрытой системы и оптимизирует среду для культивирования клеток путем автоматической корректировки концентраций газов на основании сигналов контрольного устройства.

В некоторых вариантах осуществления давление в закрытой системе постоянно или периодически контролируется. То есть давление в закрытой системе можно варьировать с помощью устройства поддержания давления, например, таким образом обеспечивая пригодность пространства для роста TIL в условиях положительного давления или стимулируя экссудацию жидкости в условиях отрицательного давления и, таким образом, стимулируя пролиферацию клеток. Кроме того, путем периодического применения отрицательного давления можно однородно и эффективно заменять циркулирующую жидкость в закрытой системе за счет временного уменьшения объема закрытого пространства.

В некоторых вариантах осуществления оптимальные культуральные компоненты, необходимые для пролиферации TIL, можно заменять или добавлять, в том числе, можно добавлять такие факторы, как IL-2 и/или OKT3, а также их комбинацию.

N. Клеточные культуры.

В одном варианте осуществления способ размножения TIL включая те, которые описаны выше, а также представлены на фиг. 9, может включать применение от около 5000 мл до около 25000 мл культуральной среды для клеток, от около 5000 мл до около 10000 мл культуральной среды для клеток или от около 5800 мл до около 8700 мл культуральной среды для клеток. В некоторых вариантах осуществления среда представляет собой бессывороточную среду, описанную, например, в примере 21. В некоторых вариантах осуществления среда при первом размножении не содержит сыворотку. В некоторых вариантах осуществления среда при втором размножении не содержит сыворотку. В некоторых вариантах осуществления как среда при первом размножении, так и среда при втором размножении, не содержит сыворотку. В одном варианте осуществления для размножения TIL применяют не более одного вида культуральной среды для клеток. Можно применять любую подходящую культуральную среду для клеток, например, культуральную среду для клеток AIM-V (L-глутамин, 50 мкМ стрептомицина сульфат и 10 мкМ гентамицина сульфат) (Invitrogen, Карлсбад, штат Калифорния). В этом отношении патентуемые способы обладают преимуществом уменьшения количества среды, а также числа видов сред, необходимых для размножения TIL. В одном варианте осуществления размножение TIL может включать подпитку клеток не чаще, чем каждый третий или четвертый день. Размножение клеток в газопроницаемом кон-

тейнере упрощает процедуры, необходимые для размножения клеток, за счет уменьшения частоты подпитки, необходимой для размножения клеток.

В варианте осуществления культуральная среда для клеток в первом и/или втором газопроницаемом контейнере является нефильтрованной. Применение нефильтрованной клеточной среды может упростить процедуры, необходимые для размножения клеток. В одном варианте осуществления в клеточной среде в первом и/или втором газопроницаемом контейнере отсутствует бета-меркаптоэтанол (BME).

В одном варианте осуществления продолжительность способа включает получение образца опухолевой ткани у млекопитающего; культивирование образца опухолевой ткани в первом газопроницаемом контейнере, содержащем клеточную среду; получение TIL из образца опухолевой ткани; размножение TIL во втором газопроницаемом контейнере, содержащем клеточную среду, в течение периода от около 7 до около 14 дней, например, около 11 дней. В некоторых вариантах осуществления pre-REP занимает около 7-14 дней, например, около 11 дней. В некоторых вариантах осуществления REP занимает около 7-14 дней, например, около 11 дней.

В одном варианте осуществления TIL размножают в газопроницаемых контейнерах. Газопроницаемые контейнеры применяли для размножения TIL с помощью PBMC посредством способов, композиций и устройств, известных в данной области техники, в том числе описанных в публикации заявки на патент США № 2005/0106717 A1, описание которой включено в настоящий документ посредством ссылки. В одном варианте осуществления TIL размножают в газопроницаемых мешках. В одном варианте осуществления TIL размножают с помощью системы размножения клеток, которая размножает TIL в газопроницаемых мешках, такой как Xuri Cell Expansion System W25 (GE Healthcare). В одном варианте осуществления TIL размножают с помощью системы размножения клеток, которая размножает TIL в газопроницаемых мешках, такой как биореакторная система WAVE, также известная как система размножения клеток Xuri W5 (GE Healthcare). В одном варианте осуществления система размножения клеток включает газопроницаемый мешок для клеток с объемом, выбранным из группы, состоящей из около 100 мл, около 200 мл, около 300 мл, около 400 мл, около 500 мл, около 600 мл, около 700 мл, около 800 мл, около 900 мл, около 1 л, около 2 л, около 3 л, около 4 л, около 5 л, около 6 л, около 7 л, около 8 л, около 9 л и около 10 л.

В одном варианте осуществления TIL могут быть размножены в колбах G-Rex (коммерчески доступных от Wilson Wolf Manufacturing). Такие варианты осуществления позволяют размножить клеточную популяцию с около 5×10^5 клеток/см^2 до от 10×10^6 до 30×10^6 клеток/см^2. В варианте осуществления это происходит без подпитки. В одном варианте осуществления это происходит без подпитки, пока среда находится на высоте около 10 см в колбе G-Rex. В одном варианте осуществления это происходит без подпитки, но с добавлением одного или более цитокинов. В одном варианте осуществления цитокин может быть добавлен в виде болюса без необходимости смешивания цитокина со средой. Такие контейнеры, устройства и способы известны в данной области техники и применялись для размножения TIL, включая описанные в публикации заявки на патент США № US 2014/0377739A1, международной публикации № WO 2014/210036 A1, публикации заявки на патент США № US 2013/0115617 A1, международной публикации № WO 2013/188427 A1, публикации заявки на патент США № US 2011/0136228 A1, патенте США № US 8809050 B2, международной публикации № WO 2011/072088 A2, публикации заявки на патент США № US 2016/0208216 A1, публикации заявки на патент США № US 2012/0244133 A1, международной публикации № WO 2012/129201 A1 публикации заявки на патент США № US 2013/0102075 A1, публикации заявки на патент США № US 8956860 B2, международной публикации № WO 2013/173835 A1, публикации заявки на патент США № US 2015/0175966 A1, описание которых включено в настоящий документ посредством ссылки. Такие процессы также описаны в Jin et al., J. Immunotherapy, 2012, 35:283-292.

O. Необязательная генетическая модификация TIL.

В некоторых вариантах осуществления TIL необязательно генетически модифицируют для включения дополнительных функциональных свойств, включая, помимо прочего, высокоаффинный Т-клеточный рецептор (TCR), например, TCR, нацеленный на опухолеассоциированный антиген, такой как MAGE-1, HER2 или NY-ESO-1, или химерный антигенный рецептор (CAR), который связывается с опухолеассоциированной молекулой клеточной поверхности (например, мезотелином) или линейно-специфической молекулой клеточной поверхности (например, CD19).

P. Необязательная криоконсервация TIL.

Либо популяцию суммарных TIL, либо размноженную популяцию TIL можно необязательно криоконсервировать. В некоторых вариантах осуществления криоконсервируют терапевтическую популяцию TIL. В некоторых вариантах осуществления криоконсервируют TIL, собранные после второго размножения. В некоторых вариантах осуществления криоконсервируют TIL на иллюстративном этапе F, показанном на фиг. 9. В некоторых вариантах осуществления TIL криоконсервируют в инфузионном пакете. В некоторых вариантах осуществления TIL криоконсервируют до помещения в инфузионный пакет. В некоторых вариантах осуществления TIL криоконсервируют и не помещают в инфузионный пакет. В некоторых вариантах осуществления криоконсервацию проводят с помощью среды для криоконсервации. В некоторых вариантах осуществления среда для криоконсервации содержит диметилсульфоксид

(DMSO). Криоконсервацию, как правило, выполняют, помещая популяцию TIL в раствор для замораживания, например, содержащий 85% сыворотки AB с инактивированным комплементом и 15% диметилсульфоксида (DMSO). Клетки в растворе помещают в криогенные флаконы и хранят в течение 24 ч при -80°C с необязательным переносом в морозильные камеры с газообразным азотом для криоконсервации, см. Sadeghi, et al., Acta Oncologica 2013, 52, 978-986.

При необходимости, клетки извлекают из морозильной камеры и размораживают при 37°C в водяной бане до тех пор, пока не будет разморожено примерно 4/5 раствора. Клетки, как правило, ресуспендируют в полной среде и необязательно промывают один или более раз. В некоторых вариантах осуществления размороженные TIL можно подсчитывать и оценивать на жизнеспособность, как известно в данной области техники.

В предпочтительном варианте осуществления популяцию TIL криоконсервируют с помощью среды для криоконсервации CS10 (CryoStor 10, BioLife Solutions). В предпочтительном варианте осуществления популяцию TIL криоконсервируют с помощью среды для криоконсервации, содержащей диметилсульфоксид (DMSO). В предпочтительном варианте осуществления популяцию TIL криоконсервируют с помощью смеси 1:1 (по объему) CS10 и культуральной среды для клеток. В предпочтительном варианте осуществления популяцию TIL криоконсервируют с помощью смеси около 1:1 (по объему) CS10 и культуральной среды для клеток, дополнительно содержащей IL-2.

Как описано выше для этапов A-E, криоконсервацию можно проводить в различные моменты времени на всем протяжении процесса размножения TIL. В некоторых вариантах осуществления можно криоконсервировать популяцию суммарных TIL после первого размножения на этапе B или размноженную популяцию TIL после одного или более вторых размножений на этапе D. Криоконсервацию, как правило, можно выполнять, помещая популяцию TIL в раствор для замораживания, например, содержащий 85% сыворотки AB с инактивированным комплементом и 15% диметилсульфоксида (DMSO). Клетки в растворе помещают в криогенные флаконы и хранят в течение 24 ч при -80°C с необязательным переносом в морозильные камеры с газообразным азотом для криоконсервации, см. Sadeghi, et al., Acta Oncologica 2013, 52, 978-986.

При необходимости, клетки извлекают из морозильной камеры и размораживают при 37°C в водяной бане до тех пор, пока не будет разморожено примерно 4/5 раствора. Клетки, как правило, ресуспендируют в полной среде и необязательно промывают один или более раз. В некоторых вариантах осуществления размороженные TIL можно подсчитывать и оценивать на жизнеспособность, как известно в данной области техники.

В некоторых случаях популяцию TIL, полученную на этапе B, можно криоконсервировать немедленно с помощью протоколов, описанных ниже. Альтернативно, популяцию суммарных TIL можно подвергать этапу C и этапу D, а затем криоконсервировать после этапа D. Аналогично, в случае, когда в терапии будут применяться генетически модифицированные TIL, популяции TIL, полученные на этапе B или этапе D, можно подвергать генетическим модификациям для соответствующего лечения.

Q. Необязательные анализы на жизнеспособность клеток.

Необязательно анализ на жизнеспособность клеток может быть выполнен после первого размножения (иногда называемого начальным суммарным размножением) с помощью стандартных анализов, известных в данной области техники. Например, для образца суммарных TIL можно проводить анализ с трипановым синим, который избирательно метит мертвые клетки и позволяет оценивать жизнеспособность. Другие анализы для тестирования жизнеспособности могут включать, помимо прочего, анализ с аламаровым синим и анализ MTT.

1. Количество клеток, жизнеспособность, проточная цитометрия.

В некоторых вариантах осуществления измеряют количество и/или жизнеспособность клеток. Экспрессию маркеров, таких как, но без ограничения, CD3, CD4, CD8 и CD56, а также любых других, раскрытых или описанных в настоящем документе, можно измерять методом проточной цитометрии с антителами, например, но без ограничения, теми, которые коммерчески доступны от компании BD Biosciences (BD Biosciences, Сан-Хосе, штат Калифорния), с помощью проточного цитометра FACSCanto™ (BD Biosciences). Клетки можно подсчитывать вручную с помощью одноразового гемоцитометра C-chip (VWR, Батавия, штат Иллинойс), а жизнеспособность можно оценивать любым методом, известным в данной области техники, включая, помимо прочего, окрашивание трипановым синим.

В некоторых случаях популяцию суммарных TIL можно криоконсервировать немедленно с помощью протоколов, описанных ниже. Альтернативно популяция суммарных TIL может быть подвергнута REP, а затем криоконсервирована, как описано ниже. Аналогично, в случае, когда в терапии будут применяться генетически модифицированные TIL, популяции суммарных или REP TIL можно подвергать генетическим модификациям для подходящего лечения.

2. Клеточные культуры.

В одном варианте осуществления способ размножения TIL может включать применение от около 5000 мл до около 25000 мл культуральной среды для клеток, от около 5000 мл до около 10000 мл культуральной среды для клеток или от около 5800 мл до около 8700 мл культуральной среды для клеток. В одном варианте осуществления для размножения TIL применяют не более одного вида культуральной

среды для клеток. Можно применять любую подходящую культуральную среду для клеток, например, культуральную среду для клеток AIM-V (L-глутамин, 50 мкМ стрептомицина сульфат и 10 мкМ гентамицина сульфат) (Invitrogen, Карлсбад, штат Калифорния). В этом отношении патентуемые способы обладают преимуществом уменьшения количества среды, а также числа видов сред, необходимых для размножения TIL. В одном варианте осуществления размножение TIL может включать подпитку клеток не чаще, чем каждый третий или четвертый день. Размножение клеток в газопроницаемом контейнере упрощает процедуры, необходимые для размножения клеток, за счет уменьшения частоты подпитки, необходимой для размножения клеток.

В варианте осуществления культуральная среда для клеток в первом и/или втором газопроницаемом контейнере является нефильтрованной. Применение нефильтрованной клеточной среды может упростить процедуры, необходимые для размножения клеток. В одном варианте осуществления в клеточной среде в первом и/или втором газопроницаемом контейнере отсутствует бета-меркаптоэтанол (BME).

В одном варианте осуществления продолжительность способа включает получение образца опухолевой ткани у млекопитающего; культивирование образца опухолевой ткани в первом газопроницаемом контейнере, содержащем клеточную среду; получение TIL из образца опухолевой ткани; размножение TIL во втором газопроницаемом контейнере, содержащем клеточную среду, с помощью aAPC в течение периода от около 14 до около 42 дней, например, около 28 дней.

В одном варианте осуществления TIL размножают в газопроницаемых контейнерах. Газопроницаемые контейнеры применяли для размножения TIL с помощью PBMC посредством способов, композиций и устройств, известных в данной области техники, в том числе описанных в публикации заявки на патент США № 2005/0106717 A1, описание которой включено в настоящий документ посредством ссылки. В одном варианте осуществления TIL размножают в газопроницаемых мешках. В одном варианте осуществления TIL размножают с помощью системы размножения клеток, которая размножает TIL в газопроницаемых мешках, такой как Xuri Cell Expansion System W25 (GE Healthcare). В одном варианте осуществления TIL размножают с помощью системы размножения клеток, которая размножает TIL в газопроницаемых мешках, такой как биореакторная система WAVE, также известная как система размножения клеток Xuri W5 (GE Healthcare). В одном варианте осуществления система размножения клеток включает газопроницаемый мешок для клеток с объемом, выбранным из группы, состоящей из около 100 мл, около 200 мл, около 300 мл, около 400 мл, около 500 мл, около 600 мл, около 700 мл, около 800 мл, около 900 мл, около 1 л, около 2 л, около 3 л, около 4 л, около 5 л, около 6 л, около 7 л, около 8 л, около 9 л и около 10 л.

В одном варианте осуществления TIL могут быть размножены в колбах G-Rex (коммерчески доступных от Wilson Wolf Manufacturing). Такие варианты осуществления позволяют размножить клеточную популяцию с около 5×10^5 клеток/см^2 до от 10×10^6 до 30×10^6 клеток/см^2. В варианте осуществления это происходит без подпитки. В одном варианте осуществления это происходит без подпитки, пока среда находится на высоте около 10 см в колбе G-Rex. В одном варианте осуществления это происходит без подпитки, но с добавлением одного или более цитокинов. В одном варианте осуществления цитокин может быть добавлен в виде болюса без необходимости смешивания цитокина со средой. Такие контейнеры, устройства и способы известны в данной области техники и применялись для размножения TIL, включая описанные в публикации заявки на патент США № US 2014/0377739 A1, международной публикации № WO 2014/210036 A1, публикации заявки на патент США № US 2013/0115617 A1, международной публикации № WO 2013/188427 A1, публикации заявки на патент США № US 2011/0136228 A1, патенте США № US 8809050 B2, международной публикации № WO 2011/072088 A2, публикации заявки на патент США № US 2016/0208216 A1, публикации заявки на патент США № US 2012/0244133 A1, международной публикации № WO 2012/129201 A1, публикации заявки на патент США № US 2013/0102075 A1, публикации заявки на патент США № US 8956860 B2, международной публикации № WO 2013/173835 A1, публикации заявки на патент США № US 2015/0175966 A1, описание которых включено в настоящий документ посредством ссылки. Такие процессы также описаны в Jin et al., J. Immunotherapy, 2012, 35:283-292.

Необязательная генетическая модификация TIL.

В некоторых вариантах осуществления TIL необязательно генетически модифицируют для включения дополнительных функциональных свойств, включая, помимо прочего, высокоаффинный Т-клеточный рецептор (TCR), например, TCR, нацеленный на опухолеассоциированный антиген, такой как MAGE-1, HER2 или NY-ESO-1, или химерный антигенный рецептор (CAR), который связывается с опухолеассоциированной молекулой клеточной поверхности (например, мезотелином) или линейно-специфической молекулой клеточной поверхности (например, CD19).

IV. Способы лечения пациентов.

Способы лечения начинают со сбора исходных TIL и культивирования TIL. Такие способы описаны в данной области техники, например, в публикации Jin et al., J. Immunotherapy, 2012, 35(3):283-292, полное содержание которой включено в настоящий документ посредством ссылки. Варианты осуществления способов лечения описаны в разделах, приведенных ниже, в том числе, в примерах.

Размноженные TIL, полученные способами, описанными в настоящем документе, включая, напри-

мер, способы, описанные для этапов A-F, выше или в соответствии с этапами A-F (также представленные, например, на фиг. 2A и/или 9), находят конкретное применение для лечения пациентов, страдающих от рака (например, как описано в публикации Goff, et al., J. Clinical Oncology, 2016, 34(20):2389-239, а также в дополнении; полное содержание включено в настоящий документ посредством ссылки). В некоторых вариантах осуществления TIL выращивали из резецированной метастатической меланомы, как описано ранее (см. Dudley, et al., J Immunother., 2003, 26:332-342; полное содержание включено в настоящий документ посредством ссылки). Свежую опухоль можно иссекать в стерильных условиях. Репрезентативный образец можно отбирать для формального анализа патологии. Можно применять одиночные фрагменты объемом от 2 $мм^3$ до 3 $мм^3$. В некоторых вариантах осуществления получают 5, 10, 15, 20, 25 или 30 образцов для каждого пациента. В некоторых вариантах осуществления получают 20, 25 или 30 образцов для каждого пациента. В некоторых вариантах осуществления получают 20, 22, 24, 26 или 28 образцов для каждого пациента. В некоторых вариантах осуществления получают 24 образца для каждого пациента. Образцы можно помещать в отдельные лунки 24-луночного планшета, поддерживать в питательной среде с высокой дозой IL-2 (6000 МЕ/мл) и контролировать на разрушение опухоли и/или пролиферацию TIL. Любую опухоль с жизнеспособными клетками, оставшимися после обработки, можно расщеплять ферментами до одноклеточной суспензии и криоконсервировать, как описано в настоящем документе.

В некоторых вариантах осуществления можно отбирать образец успешно растущих TIL для фенотипического анализа (CD3, CD4, CD8 и CD56) и тестировать в сравнении с аутологичной опухолью, при наличии. TIL можно считать активными, если совместное культивирование в течение ночи приводит к секреции гамма-интерферона (IFN-γ) на уровнях более 200 пг/мл и дважды превышающих уровень фона. (Goff, et al., JImrmmother., 2010, 33:840-847; полное содержание включено в настоящий документ посредством ссылки). В некоторых вариантах осуществления культуры с признаками аутологичной активности или подходящими паттернами роста можно выбирать для второго размножения (например, второго размножения, показанного на этапе D фиг. 2A и/или 9), включая второе размножение, которое иногда называют быстрым размножением (REP). В некоторых вариантах осуществления размноженные TIL с высокой аутологичной активностью (например, высокой степенью пролиферации в процессе второго размножения) выбирают для дополнительного второго размножения. В некоторых вариантах осуществления TIL с высокой аутологичной активностью (например, высокой степенью пролиферации в процессе второго размножения, как показано на этапе D фиг. 2A и/или 9), выбирают для дополнительного второго размножения, как показано на этапе D фиг. 2A и/или 9.

В некоторых вариантах осуществления для пациента не проводят сразу ACT (адоптивный перенос клеток), например, в некоторых вариантах осуществления после получения опухоли и/или первого размножения клетки не используют немедленно. В некоторых вариантах осуществления TIL можно криоконсервировать и размораживать за 2 дня до введения пациенту. В некоторых вариантах осуществления TIL можно криоконсервировать и размораживать за 1 день до введения пациенту. В некоторых вариантах осуществления TIL можно криоконсервировать и размораживать непосредственно до введения пациенту.

Клеточные фенотипы криоконсервированных образцов TIL из инфузионного пакета можно анализировать методом проточной цитометрии (например, FlowJo) на поверхностные маркеры CD3, CD4, CD8, CCR7 и CD45RA (BD BioSciences), а также любыми способами, описанными в настоящем документе. Сывороточные цитокины можно определять стандартными методами твердофазного иммуноферментного анализа. Повышение в сыворотке уровня IFN-γ определяют на основании концентрации более 100 пг/мл и превышения базовых уровней IFN-γ в по меньшей мере 4 раза или по меньшей мере 3 раза, или по меньшей мере 2 раза, или по меньшей мере 1 раз. В некоторых вариантах осуществления повышение в сыворотке уровня IFN-γ определяют на основании концентрации более 1000 пг/мл. В некоторых вариантах осуществления повышение в сыворотке уровня IFN-γ определяют на основании концентрации более 200 пг/мл. В некоторых вариантах осуществления повышение в сыворотке уровня IFN-γ определяют на основании концентрации более 250 пг/мл. В некоторых вариантах осуществления повышение в сыворотке уровня IFN-γ определяют на основании концентрации более 300 пг/мл. В некоторых вариантах осуществления повышение в сыворотке уровня IFN-γ определяют на основании концентрации более 350 пг/мл. В некоторых вариантах осуществления повышение в сыворотке уровня IFN-γ определяют на основании концентрации более 400 пг/мл. В некоторых вариантах осуществления повышение в сыворотке уровня IFN-γ определяют на основании концентрации более 450 пг/мл. В некоторых вариантах осуществления повышение в сыворотке уровня IFN-γ определяют на основании концентрации более 500 пг/мл. В некоторых вариантах осуществления повышение в сыворотке уровня IFN-γ определяют на основании концентрации более 550 пг/мл. В некоторых вариантах осуществления повышение в сыворотке уровня IFN-γ определяют на основании концентрации более 600 пг/мл. В некоторых вариантах осуществления повышение в сыворотке уровня IFN-γ определяют на основании концентрации более 650 пг/мл. В некоторых вариантах осуществления повышение в сыворотке уровня IFN-γ определяют на основании концентрации более 700 пг/мл. В некоторых вариантах осуществления повышение в сыворотке уровня IFN-γ определяют на основании концентрации более 750 пг/мл. В некоторых вариантах осуществления повы-

шение в сыворотке уровня IFN-γ определяют на основании концентрации более 800 пг/мл. В некоторых вариантах осуществления повышение в сыворотке уровня IFN-γ определяют на основании концентрации более 850 пг/мл. В некоторых вариантах осуществления повышение в сыворотке уровня IFN-γ определяют на основании концентрации более 900 пг/мл. В некоторых вариантах осуществления повышение в сыворотке уровня IFN-γ определяют на основании концентрации более 950 пг/мл. В некоторых вариантах осуществления повышение в сыворотке уровня IFN-γ определяют на основании концентрации более 1000 пг/мл.

В некоторых вариантах осуществления TIL, полученные способами, предложенными в настоящем документе, например, теми, которые представлены на фиг. 2A и/или 9, отличаются неожиданным повышением клинической эффективности TIL. В некоторых вариантах осуществления TIL, полученные способами, предложенными в настоящем документе, например, способами, представленными на фиг. 2A и/или 9, имеют повышенную клиническую эффективность в сравнении с TIL, полученными способами, отличными от описанных в настоящем документе, включая, например, способы, отличные от представленных на фиг. 2A и/или 9. В некоторых вариантах осуществления способы, отличные от описанных в настоящем документе, включают способы, называемые процессом 1C и/или процессом поколения 1 (Gen 1). В некоторых вариантах осуществления повышенную клиническую эффективность определяют на основании DCR, ORR и/или других клинических ответов. В некоторых вариантах осуществления TIL, полученные способами, предложенными в настоящем документе, например, способами, представленными на фиг. 2A и/или 9, демонстрируют аналогичное время до развития ответа и профиль безопасности в сравнении с TIL, полученными способами, отличными от описанных в настоящем документе, включая, например, способы, отличные от представленных на фиг. 2A и/или 9, например, процессом Gen 1.

В некоторых вариантах осуществления гамма-интерферон (IFN-γ) является показателем эффективности лечения и/или повышенной клинической эффективности. В некоторых вариантах осуществления IFN-γ в крови у субъектов, получавших лечение TIL, является показателем наличия активных TIL. В некоторых вариантах осуществления применяют анализ эффективности, основанный на определении продуцирования IFN-γ. Продуцирование IFN-γ является еще одним показателем цитотоксического потенциала. Продуцирование IFN-γ можно измерять путем определения уровней цитокина IFN-γ в крови, сыворотке или TIL ex vivo от субъекта, получавшего лечение TIL, полученными способами по настоящему изобретению, в том числе способами, описанными, например, на фиг. 2A и/или 9. В некоторых вариантах осуществления увеличение уровня IFN-γ является показателем эффективности лечения пациента, получавшего лечение TIL, полученными способами по настоящему изобретению. В некоторых вариантах осуществления уровень IFN-γ увеличен в один раз, два раза, три раза, четыре раза или пять раз, или более в сравнении с не получавшим лечение пациентом и/или в сравнении с пациентом, получавшим лечение TIL, полученными способами, отличными от предложенных в настоящем документе, включая, например, способы, отличные от представленных на фиг. 2A и/или 9. В некоторых вариантах осуществления секреция IFN-γ увеличена в один раз в сравнении с не получавшим лечение пациентом и/или в сравнении с пациентом, получавшим лечение TIL, полученными способами, отличными от предложенных в настоящем документе, включая, например, способы, отличные от представленных на фиг. 2A и/или 9. В некоторых вариантах осуществления секреция IFN-γ увеличена в два раза в сравнении с не получавшим лечение пациентом и/или в сравнении с пациентом, получавшим лечение TIL, полученными способами, отличными от предложенных в настоящем документе, включая, например, способы, отличные от представленных на фиг. 2A и/или 9. В некоторых вариантах осуществления секреция IFN-γ увеличена в три раза в сравнении с не получавшим лечение пациентом и/или в сравнении с пациентом, получавшим лечение TIL, полученными способами, отличными от предложенных в настоящем документе, включая, например, способы, отличные от представленных на фиг. 2A и/или 9. В некоторых вариантах осуществления секреция IFN-γ увеличена в четыре раза в сравнении с не получавшим лечение пациентом и/или в сравнении с пациентом, получавшим лечение TIL, полученными способами, отличными от предложенных в настоящем документе, включая, например, способы, отличные от представленных на фиг. 2A и/или 9. В некоторых вариантах осуществления секреция IFN-γ увеличена в пять раз в сравнении с не получавшим лечение пациентом и/или в сравнении с пациентом, получавшим лечение TIL, полученными способами, отличными от предложенных в настоящем документе, включая, например, способы, отличные от представленных на фиг. 2A и/или 9. В некоторых вариантах осуществления уровень IFN-γ измеряют с помощью набора Quantikine ELISA. В некоторых вариантах осуществления уровень IFN-γ измеряют в TIL ex vivo от субъекта, получавшего лечение TIL, полученными способами по настоящему изобретению, включая способы, описанные, например, на фиг. 2A и/или 9. В некоторых вариантах осуществления уровень IFN-γ измеряют в крови субъекта, получавшего лечение TIL, полученными способами по настоящему изобретению, включая способы, описанные, например, на фиг. 2A и/или 9. В некоторых вариантах осуществления уровень IFN-γ измеряют в сыворотке TIL от субъекта, получавшего лечение TIL, полученными способами по настоящему изобретению, включая способы, описанные, например, на фиг. 2A и/или 9.

В некоторых вариантах осуществления TIL, полученные способами по настоящему изобретению,

включая способы, описанные, например, на фиг. 2A и/или 9, отличаются повышенной поликлональностью в сравнении с TIL, полученными иными способами, включая способы, которые не представлены на фиг. 2A и/или 9, такими как, например, способы, называемые процессом 1C. В некоторых вариантах осуществления значительно улучшенная поликлональность и/или повышенная поликлональность является показателем эффективности лечения и/или повышенной клинической эффективности. В некоторых вариантах осуществления поликлональность означает разнообразие репертуара Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления повышение поликлональности может быть показателем эффективности лечения, связанного с введением TIL, полученных способами по настоящему изобретению. В некоторых вариантах осуществления поликлональность увеличена в один раз, в два раза, в десять раз, в 100 раз, в 500 раз или в 1000 раз в сравнении с TIL, полученными способами, отличными от предложенных в настоящем документе, включая, например, способы, отличные от представленных на фиг. 2A и/или 9. В некоторых вариантах осуществления поликлональность увеличена в один раз в сравнении с не получавшим лечение пациентом и/или в сравнении с пациентом, получавшим лечение TIL, полученными способами, отличными от предложенных в настоящем документе, включая, например, способы, отличные от представленных на фиг. 2A и/или 9. В некоторых вариантах осуществления поликлональность увеличена в два раза в сравнении с не получавшим лечение пациентом и/или в сравнении с пациентом, получавшим лечение TIL, полученными способами, отличными от предложенных в настоящем документе, включая, например, способы, отличные от представленных на фиг. 2A и/или 9. В некоторых вариантах осуществления поликлональность увеличена в десять раз в сравнении с не получавшим лечение пациентом и/или в сравнении с пациентом, получавшим лечение TIL, полученными способами, отличными от предложенных в настоящем документе, включая, например, способы, отличные от представленных на фиг. 2A и/или 9. В некоторых вариантах осуществления поликлональность увеличена в 100 раз в сравнении с не получавшим лечение пациентом и/или в сравнении с пациентом, получавшим лечение TIL, полученными способами, отличными от предложенных в настоящем документе, включая, например, способы, отличные от представленных на фиг. 2A и/или 9. В некоторых вариантах осуществления поликлональность увеличена в 500 раз в сравнении с не получавшим лечение пациентом и/или в сравнении с пациентом, получавшим лечение TIL, полученными способами, отличными от предложенных в настоящем документе, включая, например, способы, отличные от представленных на фиг. 2A и/или 9. В некоторых вариантах осуществления поликлональность увеличена в 1000 раз в сравнении с не получавшим лечение пациентом и/или в сравнении с пациентом, получавшим лечение TIL, полученными способами, отличными от предложенных в настоящем документе, включая, например, способы, отличные от представленных на фиг. 2A и/или 9.

Показатели эффективности могут включать количественные показатели частоты контроля заболевания (DCR), а также частоты общего ответа (ORR), как известно в данной области техники, а также описано в настоящем документе.

A. Способы лечения рака и других заболеваний.

Композиции и способы, описанные в настоящем документе, можно применять для лечения заболеваний. В одном варианте осуществления они предназначены для применения в лечении гиперпролиферативных заболеваний, таких как рак, у взрослых пациентов или педиатрических пациентов. Они также могут быть применяться в лечении других заболеваний, описанных в настоящем документе и следующих далее разделах.

В некоторых вариантах осуществления гиперпролиферативное заболевание представляет собой рак. В некоторых вариантах осуществления гиперпролиферативное заболевание представляет собой солидную злокачественную опухоль. В некоторых вариантах осуществления солидную злокачественную опухоль выбирают из группы, состоящей из анального рака, рака мочевого пузыря, рака молочной железы (включая трижды негативный рак молочной железы), рака костей, рака, вызванного вирусом папилломы человека (ВПЧ), рака, ассоциированного с центральной нервной системой (включая эпендимому, медуллобластому, нейробластому, пинеобластому и примитивную нейроэктодермальную опухоль), рака шейки матки (включая плоскоклеточный рак шейки матки, аденосквамозный рак шейки матки и аденокарциному шейки матки), рака толстой кишки, колоректального рака, рака эндометрия, рака пищевода, рака пищеводно-желудочного соединения, рака желудка, рака желудочно-кишечного тракта, стромальной опухоли желудочно-кишечного тракта, глиобластомы, глиомы, рака головы и шеи (включая плоскоклеточный рак головы и шеи (HNSCC), рак гортаноглотки, рак гортани, рак носоглотки, рак ротоглотки и рак глотки), рака почки, рака печени, рака легкого (включая немелкоклеточный рак легкого (NSCLC) и мелкоклеточный рак легкого), меланомы (включая увеальную меланому, меланому хориоидеи, меланому цилиарного тела или меланому радужки), мезотелиомы (включая злокачественную мезотелиому плевры), рака яичников, рака поджелудочной железы (включая аденокарциному протоков поджелудочной железы), рака полового члена, рака прямой кишки, рака почки, почечно-клеточного рака, саркомы (включая саркому Юинга, остеосаркому, рабдомиосаркому и другие саркомы костей и мягких тканей), рака щитовидной железы (включая анапластический рак щитовидной железы), рака матки и рака влагалища.

В некоторых вариантах осуществления гиперпролиферативное заболевание представляет собой гематологическое злокачественное новообразование. В некоторых вариантах осуществления гематологи-

ческое злокачественное новообразование выбирают из группы, состоящей из хронического лимфоцитарного лейкоза, острого лимфобластного лейкоза, диффузной крупноклеточной В-клеточной лимфомы, неходжкинской лимфомы, лимфомы Ходжкина, фолликулярной лимфомы, лимфомы из клеток мантийной зоны и множественной миеломы. В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к способу лечения пациента, страдающего от рака, при этом рак представляет собой гематологическое злокачественное новообразование. В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к способу лечения пациента, страдающего от рака, с помощью TIL, MIL или PBL, модифицированных для экспрессии одного или более CCR, причем рак представляет собой гематологическое злокачественное новообразование. В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к способу лечения пациента, страдающего от рака, с помощью MIL или PBL, модифицированных для экспрессии одного или более CCR, причем рак представляет собой гематологическое злокачественное новообразование.

В одном варианте осуществления рак представляет собой один из вышеуказанных видов рака, включая солидные злокачественные опухоли и гематологические злокачественные новообразования, который является рецидивирующим или рефрактерным к лечению по меньшей мере одной предшествующей терапией, включая химиотерапию, лучевую терапию или иммунотерапию. В одном варианте осуществления рак представляет собой один из вышеуказанных видов рака, который является рецидивирующим или рефрактерным к лечению по меньшей мере двумя видами предшествующей терапии, включая химиотерапию, лучевую терапию и/или иммунотерапию. В одном варианте осуществления рак представляет собой один из вышеуказанных видов рака, который является рецидивирующим или рефрактерным к лечению по меньшей мере тремя видами предшествующей терапии, включая химиотерапию, лучевую терапию и/или иммунотерапию.

В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой рак с высокой микросателлитной нестабильностью (MSI-H) или рак с дефицитом репарации несоответствия (dMMR). Таким образом, рак MSI-H и dMMR и его тестирование описаны в публикации Kawakami, et al., Curr. Treat. Options Oncol. 2015, 16, 30, описание которой включено в настоящий документ посредством ссылки.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к способу лечения пациента, страдающего от рака, с помощью TIL, MIL или PBL, модифицированных для экспрессии одного или более CCR, причем пациент представляет собой человека. В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к способу лечения пациента, страдающего от рака, с помощью TIL, MIL или PBL, модифицированных для экспрессии одного или более CCR, причем пациент представляет собой субъекта, отличного от человека. В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к способу лечения пациента, страдающего от рака, с помощью TIL, MIL или PBL, модифицированных для экспрессии одного или более CCR, причем пациент представляет собой домашнее животное. В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к способу лечения пациента, страдающего от рака, с помощью TIL, MIL или PBL, модифицированных для экспрессии одного или более CCR, причем пациент представляет собой примата, лошадь, собаку или кошку.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к способу лечения пациента, страдающего от рака, причем рак является рефрактерным к лечению ингибитором BRAF и/или ингибитором МЕК. В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к способу лечения пациента, страдающего от рака, причем рак является рефрактерным к лечению ингибитором BRAF, выбранным из группы, состоящей из вемурафениба, дабрафениба, энкорафениба, сорафениба и их фармацевтически приемлемых солей или сольватов. В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к способу лечения пациента, страдающего от рака, причем рак является рефрактерным к лечению ингибитором МЕК, выбранным из группы, состоящей из траметиниба, кобиметиниба, биметиниба, селуметиниба, пимасертиниба, рефаметиниба и их фармацевтически приемлемых солей или сольватов. В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к способу лечения пациента, страдающего от рака, причем рак является рефрактерным к лечению ингибитором BRAF, выбранным из группы, состоящей из вемурафениба, дабрафениба, энкорафениба, сорафениба и их фармацевтически приемлемых солей или сольватов, и ингибитором МЕК, выбранным из группы, состоящей из траметиниба, кобиметиниба, биниметиниба, селуметиниба, пимасертиниба, рефаметиниба и их фармацевтически приемлемых солей или сольватов.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к способу лечения пациента, страдающего от рака, причем рак представляет собой детский рак.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к способу лечения пациента, страдающего от рака, причем рак представляет собой увеальную меланому.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к способу лечения пациента, страдающего от рака, причем увеальная меланома представляет собой меланому хориоидеи, меланому цилиарного тела или меланому радужки.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к способу лечения пациента, страдающего от рака, причем детский рак представляет собой нейробластому.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к способу лечения паци-

ента, страдающего от рака, причем детский рак представляет собой саркому.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к способу лечения пациента, страдающего от рака, причем саркома представляет собой остеосаркому.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к способу лечения пациента, страдающего от рака, причем саркома представляет собой саркому мягких тканей.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к способу лечения пациента, страдающего от рака, причем саркома мягких тканей представляет собой рабдомиосаркому, саркому Юинга или примитивную нейроэктодермальную опухоль (PNET).

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к способу лечения пациента, страдающего от рака, причем детский рак представляет собой рак, связанный с центральной нервной системой (ЦНС). В некоторых вариантах осуществления детский рак является рефрактерным к лечению химиотерапией. В некоторых вариантах осуществления детский рак является рефрактерным к лечению лучевой терапией. В некоторых вариантах осуществления детский рак является рефрактерным к лечению динутуксимабом.

В некоторых вариантах осуществления настоящее относится к способу лечения пациента, страдающего от рака, причем рак, связанный с ЦНС, представляет собой медуллобластому, пинеобластому, глиому, эпендимому или глиобластому.

Композиции и способы, описанные в настоящем документе, можно применять в способе лечения рака, причем рак является рефрактерным или резистентным к лечению антителом к PD-1 или к PD-L1. В некоторых вариантах осуществления пациент является пациентом с первичной рефрактерностью к антителу к PD-1 или к PD-L1. В некоторых вариантах осуществления у пациента не наблюдается предшествующего ответа на антитело к PD-1 или к PD-L1. В некоторых вариантах осуществления у пациента наблюдается предшествующий ответ на антитело к PD-1 или к PD-L1 с последующим прогрессированием рака у пациента. В некоторых вариантах осуществления рак является рефрактерным к антителу к CTLA-4 и/или антителу к PD-1 или к PD-L1 в комбинации с по меньшей мере одним химиотерапевтическим агентом. В некоторых вариантах осуществления предшествующий химиотерапевтический агент представляет собой карбоплатин, паклитаксел, пеметрексед и/или цисплатин. В некоторых предшествующих вариантах осуществления химиотерапевтический агент(ы) представляет собой химиотерапевтический агент на основе дублетов платины. В некоторых вариантах осуществления терапия на основе дублетов платины включает первый химиотерапевтический агент, выбранный из группы, состоящей из цисплатина и карбоплатина, и второй химиотерапевтический агент, выбранный из группы, состоящей из винорелбина, гемцитабина и таксана (включая, например, паклитаксел, доцетаксел или наб-паклитаксел). В некоторых вариантах осуществления химиотерапевтический агент на основе дублетов платины находится в комбинации с пеметрекседом.

В некоторых вариантах осуществления NSCLC является PD-L1-отрицательным и/или происходит от пациента, страдающего от рака, который экспрессирует PD-L1 с баллом пропорции опухоли (TPS) менее 1%, как описано в других разделах настоящего документа.

В некоторых вариантах осуществления NSCLC является рефракторным к комбинированной терапии, включающей антитело к PD-1 или к PD-L1 и терапию основе дублетов платины, причем терапия на основе дублетов платины включает:

i) первый химиотерапевтический агент, выбранный из группы, состоящей из цисплатина и карбоплатина,

ii) и второй химиотерапевтический агент, выбранный из группы, состоящей из винорелбина, гемцитабина и таксана (включая, например, паклитаксел, доцетаксел или наб-паклитаксел).

В некоторых вариантах осуществления NSCLC является рефракторным к комбинированной терапии, включающей антитело к PD-1 или к PD-L1, пеметрексед и терапию основе дублетов платины, причем терапия на основе дублетов платины включает:

i) первый химиотерапевтический агент, выбранный из группы, состоящей из цисплатина и карбоплатина,

ii) и второй химиотерапевтический агент, выбранный из группы, состоящей из винорелбина, гемцитабина и таксана (включая, например, паклитаксел, доцетаксел или наб-паклитаксел).

В некоторых вариантах осуществления NSCLC лечили антителом к PD-1. В некоторых вариантах осуществления NSCLC лечили антителом к PD-L1. В некоторых вариантах осуществления пациент с NSCLC не получал лечения. В некоторых вариантах осуществления NSCLC не лечили антителом к PD-1. В некоторых вариантах осуществления NSCLC не лечили антителом к PD-L1. В некоторых вариантах осуществления NSCLC ранее лечили химиотерапевтическим агентом. В некоторых вариантах осуществления NSCLC ранее лечили химиотерапевтическим агентом, но больше не лечат химиотерапевтическим агентом. В некоторых вариантах осуществления пациент с NSCLC не получал лечения антителом к PD-1/PD-L1. В некоторых вариантах осуществления пациент с NSCLC имеет низкую экспрессию PD-L1. В некоторых вариантах осуществления пациент с NSCLC не получал лечения от NSCLC или проходил лечение после химиотерапии, но не получал лечения антителом к PD-1/PD-L1. В некоторых вариантах осуществления пациент с NSCLC не получал лечения или проходил лечение после химиотерапии, но не получал лечения антителом к PD-1/PD-L1 и имеет низкую экспрессию PD-L1. В

некоторых вариантах осуществления пациент с NSCLC имеет объемное заболевание на исходном уровне. В некоторых вариантах осуществления субъект имеет объемное заболевание на исходном уровне и имеет низкую экспрессию PD-L1. В некоторых вариантах осуществления у пациента, страдающего NSCLC, отсутствует определяемая экспрессия PD-L1. В некоторых вариантах осуществления пациент с NSCLC ранее не получал лечения или проходил лечение после химиотерапии, но не получал лечения антителом к PD-1/PD-L1 и у него отсутствует определяемая экспрессия PD-L1. В некоторых вариантах осуществления пациент имеет объемное заболевание на исходном уровне и у него отсутствует определяемая экспрессия PD-L1. В некоторых вариантах осуществления пациент с NSCLC ранее не получал лечения от NSCLC или проходил лечение после химиотерапии (например, постхимиотерапевтическим агентом), но не получал лечения антителом к PD-1/PD-L1, имеет низкую экспрессию PD-L1 и/или объемное заболевание на исходном уровне. В некоторых вариантах осуществления объемное заболевание указывается, когда максимальный диаметр опухоли превышает 7 см, измеренный либо в поперечной, либо в коронарной плоскости. В некоторых вариантах осуществления объемное заболевание указывается при наличии опухших лимфатических узлов с диаметром по короткой оси 20 мм или более. В некоторых вариантах осуществления химиотерапевтическое средство включает стандартное терапевтическое средство для лечения NSCLC.

В некоторых вариантах осуществления экспрессия PD-L1 определяется баллом пропорции опухоли. В некоторых вариантах осуществления субъект, страдающий рефрактерной опухолью NSCLC, имеет балл пропорции опухоли (TPS) менее 1%. В некоторых вариантах осуществления субъект, страдающий рефрактерной опухолью NSCLC, имеет TPS не менее 1%. В некоторых вариантах осуществления субъект, страдающий рефрактерным NSCLC, ранее получал лечение антителом к PD-1 и/или к PD-L1, а балл пропорции опухоли был определен до указанного лечения антителом к PD-1 и/или к PD-L1. В некоторых вариантах осуществления субъект, страдающий рефрактерным NSCLC, ранее получал лечение антителом к PD-L1, а балл пропорции опухоли был определен до указанного лечения антителом к PD-L1.

В некоторых вариантах осуществления TIL, полученные способами по настоящему изобретению, включая способы, описанные, например, на фиг. 1, отличаются повышенной поликлональностью в сравнении с TIL, полученными иными способами, включая способы, которые не представлены на фиг. 1, такими как, например, способы, называемые процессом 1C. В некоторых вариантах осуществления значительно улучшенная поликлональность и/или повышенная поликлональность является показателем эффективности лечения и/или повышенной клинической эффективности лечения рака. В некоторых вариантах осуществления поликлональность означает разнообразие репертуара Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления повышение поликлональности может быть показателем эффективности лечения, связанного с введением TIL, полученных способами по настоящему изобретению. В некоторых вариантах осуществления поликлональность увеличена в один раз, в два раза, в десять раз, в 100 раз, в 500 раз или в 1000 раз в сравнении с TIL, полученными способами, отличными от предложенных в настоящем документе, включая, например, способы, отличные от представленных на фиг. 1. В некоторых вариантах осуществления поликлональность увеличена в один раз в сравнении с не получавшим лечение пациентом и/или в сравнении с пациентом, получавшим лечение TIL, полученными способами, отличными от предложенных в настоящем документе, включая, например, способы, отличные от представленных на фиг. 1. В некоторых вариантах осуществления поликлональность увеличена в два раза в сравнении с не получавшим лечение пациентом и/или в сравнении с пациентом, получавшим лечение TIL, полученными способами, отличными от предложенных в настоящем документе, включая, например, способы, отличные от представленных на фиг. 1. В некоторых вариантах осуществления поликлональность увеличена в десять раз в сравнении с не получавшим лечение пациентом и/или в сравнении с пациентом, получавшим лечение TIL, полученными способами, отличными от предложенных в настоящем документе, включая, например, способы, отличные от представленных на фиг. 1. В некоторых вариантах осуществления поликлональность увеличена в 100 раз в сравнении с не получавшим лечение пациентом и/или в сравнении с пациентом, получавшим лечение TIL, полученными способами, отличными от предложенных в настоящем документе, включая, например, способы, отличные от представленных на фиг. 1. В некоторых вариантах осуществления поликлональность увеличена в 500 раз в сравнении с не получавшим лечение пациентом и/или в сравнении с пациентом, получавшим лечение TIL, полученными способами, отличными от предложенных в настоящем документе, включая, например, способы, отличные от представленных на фиг. 1. В некоторых вариантах осуществления поликлональность увеличена в 1000 раз в сравнении с не получавшим лечение пациентом и/или в сравнении с пациентом, получавшим лечение TIL, полученными способами, отличными от предложенных в настоящем документе, включая, например, способы, отличные от представленных на фиг. 1.

В некоторых вариантах осуществления экспрессия PD-L1 определяется по баллу пропорции опухоли с помощью еще одного способа тестирования, как описано в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления субъект или пациент, страдающий опухолью NSCLC, имеет показатель доли опухоли менее 1% (TPS). В некоторых вариантах осуществления опухоль NSCLC, имеет TPS не менее 1%. В некоторых вариантах осуществления субъект или пациент, страдающий NSCLC, ранее получал лечение антителом к PD-1 и/или к PD-L1, а балл пропорции опухоли был определен до лечения антителом к PD-1 и/или к PD-L1. В некоторых вариантах осуществления субъект или пациент с NSCLC ранее

получал лечение антителом к PD-L1, а балл пропорции опухоли был определен до лечения антителом к PD-L1. В некоторых вариантах осуществления субъект или пациент, страдающий рефрактерной или резистентной опухолью NSCLC, имеет показатель доли опухоли менее 1% (TPS). В некоторых вариантах осуществления субъект или пациент, страдающий рефрактерной или резистентной опухолью NSCLC, имеет TPS не менее 1%. В некоторых вариантах осуществления субъект или пациент, страдающий рефрактерным или резистентным NSCLC, ранее получал лечение антителом к PD-1 и/или к PD-L1, а балл пропорции опухоли был определен до лечения антителом к PD-1 и/или к PD-L1. В некоторых вариантах осуществления субъект или пациент, страдающий рефрактерным или резистентным NSCLC, ранее получал лечение антителом к PD-L1, а балл пропорции опухоли был определен до лечения антителом к PD-L1.

В некоторых вариантах осуществления NSCLC представляет собой NSCLC, который отличается баллом пропорции опухоли (TPS) или процентом жизнеспособных опухолевых клеток у пациента, взятого до терапии антителом к PD-1 или к PD-L1, демонстрирующий частичное или полное окрашивание мембраны любой интенсивности, для белка PD-L1 менее 1% (TPS менее 1%). В одном варианте осуществления NSCLC представляет собой NSCLC, который отличается TPS, выбранным из группы, состоящей из менее 50%, менее 45%, менее 40%, менее 35%, менее 30%, менее 25%, менее 20%, менее 15%, менее 10%, менее 9%, менее 8%, менее 7%, менее 6%, менее 5%, менее 4%, менее 3%, менее 2%, менее 1%, менее 0,9%, менее 0,8%, менее 0,7%, менее 0,6%, менее 0,5%, менее 0,4%, менее 0,3%, менее 0,2%, менее 0,1%, менее 0,09%, менее 0,08%, менее 0,07%, менее 0,06%, менее 0,05%, менее 0,04%, менее 0,03%, менее 0,02% и менее 0,01%. В одном варианте осуществления NSCLC представляет собой NSCLC, который отличается TPS, выбранным из группы, состоящей из около 50%, около 45%, около 40%, около 35%, около 30%, около 25%, около 20%, около 15%, около 10%, около 9%, около 8%, около 7%, около 6%, около 5%, около 4%, около 3%, около 2%, около 1%, около 0,9%, около 0,8%, около 0,7%, около 0,6%, около 0,5%, около 0,4%, около 0,3%, около 0,2%, около 0,1%, около 0,09%, около 0,08%, около 0,07%, около 0,06%, около 0,05%, около 0,04%, около 0,03%, около 0,02% и около 0,01%. В одном варианте осуществления NSCLC представляет собой NSCLC, который отличается TPS от 0% до 1%. В одном варианте осуществления NSCLC представляет собой NSCLC, который отличается TPS от 0% до 0,9%. В одном варианте осуществления NSCLC представляет собой NSCLC, который отличается TPS от 0% до 0,8%. В одном варианте осуществления NSCLC представляет собой NSCLC, который отличается TPS от 0% до 0,7%. В одном варианте осуществления NSCLC представляет собой NSCLC, который отличается TPS от 0% до 0,6%. В одном варианте осуществления NSCLC представляет собой NSCLC, который отличается TPS от 0% до 0,5%. В одном варианте осуществления NSCLC представляет собой NSCLC, который отличается TPS от 0% до 0,4%. В одном варианте осуществления NSCLC представляет собой NSCLC, который отличается TPS от 0% до 0,3%. В одном варианте осуществления NSCLC представляет собой NSCLC, который отличается TPS от 0% до 0,2%. В одном варианте осуществления NSCLC представляет собой NSCLC, который отличается TPS от 0% до 0,1%. TPS можно измерить способами, известными в данной области техники, такими как описанные в публикации Hirsch, et al., J. Thorac. Oncol. 2017, 12, 208-222 или способами, применяемыми для определения TPS до лечения пембролизумабом или другими препаратами против PD-1 или против PD-L1. Также могут применяться методы измерения TPS, одобренные Управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США. В некоторых вариантах осуществления PD-L1 представляет собой экзосомальный PD-L1. В некоторых вариантах осуществления PD-L1 обнаружен на циркулирующих опухолевых клетках.

В некоторых вариантах осуществления частичное окрашивание мембраны включает 1%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 99% или более. В некоторых вариантах осуществления полное окрашивание мембраны включает около 100% окрашивание мембраны.

В некоторых вариантах осуществления тестирование на PD-L1 может включать измерение уровней PD-L1 в сыворотке пациента. В этих вариантах осуществления измерение PD-L1 в сыворотке пациента устраняет неопределенность гетерогенности опухоли и дискомфорт пациента при серийных биопсиях.

В некоторых вариантах осуществления повышенный уровень растворимого PD-L1 в сравнении с исходным или стандартным уровнем коррелирует с ухудшением прогноза при NSCLC, см., например, Okuma, et al., Clinical Lung Cancer, 2018, 19, 410-417; Vecchiarelli, et al., Oncotarget, 2018, 9, 17554-17563. В некоторых вариантах осуществления PD-L1 представляет собой экзосомальный PD-L1. В некоторых вариантах осуществления PD-L1 экспрессируется на циркулирующих опухолевых клетках.

В одном варианте осуществления изобретение обеспечивает способ лечения немелкоклеточной карциномы легкого (NSCLC) путем введения популяции инфильтрирующих опухоль лимфоцитов (TIL) субъекту или пациенту, нуждающемуся в этом, причем субъект или пациент имеет по меньшей мере одно из следующего:

заранее определенный балл пропорции опухоли (TPS) PD-L1 менее 1%;

показатель TPS PD-L1 от 1% до 49% или

заранее определенное отсутствие одной или более драйверных мутаций;

причем драйверная мутация выбрана из группы, состоящей из мутации EGFR, вставки EGFR, мута-

ции экзона 20 EGFR, мутации KRAS, мутации BRAF, мутации ALK, мутации c-ROS (мутация ROS1), слияния ROS1, мутации RET, слияния RET, мутации ERBB2, амплификации ERBB2, мутации BRCA, мутации MAP2K1, PIK3CA, CDKN2A, мутации PTEN, мутации UMD, мутации NRAS, мутации KRAS, мутации NF1, мутации MET, сплайсинга MET и/или измененной передачи сигналов MET, мутации TP53, мутации CREBBP, мутации KMT2C, мутации KMT2D, мутации ARID1A, мутации RB1, мутации ATM, мутации SETD2, мутации FLT3, мутации PTPN11, мутации FGFR1, мутации EP300, мутации MYC, мутации EZH2, мутации JAK2, мутации FBXW7, мутации CCND3 и мутации GNA11, причем способ включает:

(a) получение первой популяции TIL из опухоли, резецированной у субъекта или пациента, путем обработки образца опухоли, полученного от субъекта, на множество фрагментов опухоли;

(b) добавление первой популяции TIL в закрытую систему;

(c) выполнение первого размножения путем культивирования первой популяции TIL в культуральной среде для клеток, содержащей IL-2, с получением второй популяции TIL, причем первое размножение выполняют в закрытом контейнере, обеспечивающем первую газопроницаемую площадь поверхности, причем первое размножение выполняют в течение около 3-14 дней с получением второй популяции TIL, причем вторая популяция TIL в по меньшей мере 50 раз больше первой популяции TIL, и причем переход от этапа (b) к этапу (c) происходит без открытия системы;

(d) выполнение второго размножения путем добавления в культуральную среду для клеток второй популяции TIL дополнительных IL-2, OKT-3 и антигенпрезентирующих клеток (APC) с получением третьей популяции TIL, причем второе размножение выполняют в течение около 7-14 дней с получением третьей популяции TIL, причем третья популяция TIL представляет собой терапевтическую популяцию TIL, причем второе размножение выполняют в закрытом контейнере, обеспечивающем вторую газопроницаемую площадь поверхности, и причем переход от этапа (c) к этапу (d) происходит без открытия системы;

(e) сбор терапевтической популяции TIL, полученной на этапе (d), причем переход от этапа (d) к этапу (e) происходит без открытия системы; и

(f) перенос собранной популяции TIL с этапа (e) в инфузионный пакет, причем перенос с этапа (e) на (f) происходит без открытия;

(g) криоконсервацию инфузионного пакета, содержащего собранную популяцию TIL на этапе (f), с помощью процесса криоконсервации; и

(h) введение субъекту или пациенту терапевтически эффективной дозы третьей популяции TIL из инфузионного пакета на этапе (g).

В одном варианте осуществления изобретение обеспечивает способ лечения немелкоклеточной карциномы легкого (NSCLC) путем введения популяции инфильтрирующих опухоль лимфоцитов (TIL) пациенту, нуждающемуся в этом, причем способ включает:

(a) тестирование опухоли пациента на экспрессию PD-L1 и балл пропорции опухоли (TPS) PD-L1;

(b) тестирование пациента на отсутствие одной или более драйверных мутаций, причем драйверная мутация выбрана из группы, состоящей из мутации EGFR, вставки EGFR, мутации экзона 20 EGFR, мутации KRAS, мутации BRAF, мутации ALK, мутации c-ROS (мутация ROS1), слияния ROS1, мутации RET, слияния RET, мутации ERBB2, амплификации ERBB2, мутации BRCA, мутации MAP2K1, PIK3CA, CDKN2A, мутации PTEN, мутации UMD, мутации NRAS, мутации KRAS, мутации NF1, мутации MET, сплайсинга MET и/или измененной передачи сигналов MET, мутации TP53, мутации CREBBP, мутации KMT2C, мутации KMT2D, мутации ARID1A, мутации RB1, мутации ATM, мутации SETD2, мутации FLT3, мутации PTPN11, мутации FGFR1, мутации EP300, мутации MYC, мутации EZH2, мутации JAK2, мутации FBXW7, мутации CCND3 и мутации GNA11;

(c) определение того, что у пациента показатель TPS для PD-L1 составляет от около 1% до около 49%, и определение того, что у пациента также нет драйверных мутаций;

(d) получение первой популяции TIL из опухоли, резецированной у субъекта или пациента, путем обработки образца опухоли, полученного от субъекта, на множество фрагментов опухоли;

(e) добавление первой популяции TIL в закрытую систему;

(f) выполнение первого размножения путем культивирования первой популяции TIL в культуральной среде для клеток, содержащей IL-2, с получением второй популяции TIL, причем первое размножение выполняют в закрытом контейнере, обеспечивающем первую газопроницаемую площадь поверхности, причем первое размножение выполняют в течение около 3-14 дней с получением второй популяции TIL, причем вторая популяция TIL в по меньшей мере 50 раз больше первой популяции TIL, и причем переход от этапа (e) к этапу (f) происходит без открытия системы;

(g) выполнение второго размножения путем добавления в культуральную среду для клеток второй популяции TIL дополнительных IL-2, OKT-3 и антигенпрезентирующих клеток (APC) с получением третьей популяции TIL, причем второе размножение выполняют в течение около 7-14 дней с получением третьей популяции TIL, причем третья популяция TIL представляет собой терапевтическую популяцию TIL, причем второе размножение выполняют в закрытом контейнере, обеспечивающем вторую газопроницаемую площадь поверхности, и причем переход от этапа (f) к этапу (g) происходит без открытия сис-

темы;

(h) сбор терапевтической популяции TIL, полученной на этапе (d), причем переход от этапа (d) к этапу (e) происходит без открытия системы; и

(i) перенос собранной популяции TIL с этапа (e) в инфузионный пакет, причем перенос с этапа (e) на (f) происходит без открытия;

(j) криоконсервацию инфузионного пакета, содержащего собранную популяцию TIL на этапе (f), с помощью процесса криоконсервации; и

(k) введение субъекту или пациенту терапевтически эффективной дозы третьей популяции TIL из инфузионного пакета на этапе (g).

В одном варианте осуществления изобретение обеспечивает способ лечения немелкоклеточной карциномы легкого (NSCLC) путем введения популяции инфильтрирующих опухоль лимфоцитов (TIL) пациенту, нуждающемуся в этом, причем способ включает:

(a) тестирование опухоли пациента на экспрессию PD-L1 и балл пропорции опухоли (TPS) PD-L1;

(b) тестирование пациента на отсутствие одной или более драйверных мутаций, причем драйверная мутация выбрана из группы, состоящей из мутации EGFR, вставки EGFR, мутации экзона 20 EGFR, мутации KRAS, мутации BRAF, мутации ALK, мутации c-ROS (мутация ROS1), слияния ROS1, мутации RET, слияния RET, мутации ERBB2, амплификации ERBB2, мутации BRCA, мутации MAP2K1, PIK3CA, CDKN2A, мутации PTEN, мутации UMD, мутации NRAS, мутации KRAS, мутации NF1, мутации MET, сплайсинга MET и/или измененной передачи сигналов MET, мутации TP53, мутации CREBBP, мутации KMT2C, мутации KMT2D, мутации ARID1A, мутации RB1, мутации ATM, мутации SETD2, мутации FLT3, мутации PTPN11, мутации FGFR1, мутации EP300, мутации MYC, мутации EZH2, мутации JAK2, мутации FBXW7, мутации CCND3 и мутации GNA11;

(c) определение того, что у пациента показатель TPS для PD-L1 составляет менее около 1%, и определение того, что у пациента также нет драйверных мутаций;

(d) получение первой популяции TIL из опухоли, резецированной у субъекта или пациента, путем обработки образца опухоли, полученного от субъекта, на множество фрагментов опухоли;

(e) добавление первой популяции TIL в закрытую систему;

(f) выполнение первого размножения путем культивирования первой популяции TIL в культуральной среде для клеток, содержащей IL-2, с получением второй популяции TIL, причем первое размножение выполняют в закрытом контейнере, обеспечивающем первую газопроницаемую площадь поверхности, причем первое размножение выполняют в течение около 3-14 дней с получением второй популяции TIL, причем вторая популяция TIL в по меньшей мере 50 раз больше первой популяции TIL, и причем переход от этапа (e) к этапу (f) происходит без открытия системы;

(g) выполнение второго размножения путем добавления в культуральную среду для клеток второй популяции TIL дополнительных IL-2, OKT-3 и антигенпрезентирующих клеток (APC) с получением третьей популяции TIL, причем второе размножение выполняют в течение около 7-14 дней с получением третьей популяции TIL, причем третья популяция TIL представляет собой терапевтическую популяцию TIL, причем второе размножение выполняют в закрытом контейнере, обеспечивающем вторую газопроницаемую площадь поверхности, и причем переход от этапа (f) к этапу (g) происходит без открытия системы;

(h) сбор терапевтической популяции TIL, полученной на этапе (d), причем переход от этапа (d) к этапу (e) происходит без открытия системы; и

(i) перенос собранной популяции TIL с этапа (e) в инфузионный пакет, причем перенос с этапа (e) на (f) происходит без открытия;

(j) криоконсервацию инфузионного пакета, содержащего собранную популяцию TIL на этапе (f), с помощью процесса криоконсервации; и

(k) введение субъекту или пациенту терапевтически эффективной дозы третьей популяции TIL из инфузионного пакета на этапе (g).

В одном варианте осуществления изобретение обеспечивает способ лечения немелкоклеточной карциномы легкого (NSCLC) путем введения популяции инфильтрирующих опухоль лимфоцитов (TIL) пациенту, нуждающемуся в этом, причем способ включает:

(a) тестирование опухоли пациента на экспрессию PD-L1 и балл пропорции опухоли (TPS) PD-L1;

(b) тестирование пациента на отсутствие одной или более драйверных мутаций, причем драйверная мутация выбрана из группы, состоящей из мутации EGFR, вставки EGFR, мутации KRAS, мутации BRAF, мутации ALK, мутации c-ROS (мутация ROS1), слияния ROS1, мутации RET или слияния RET;

(c) определение того, что у пациента показатель TPS для PD-L1 составляет от около 1% до около 49%, и определение того, что у пациента также нет драйверных мутаций;

(d) получение первой популяции TIL из опухоли, резецированной у субъекта или пациента, путем обработки образца опухоли, полученного от субъекта, на множество фрагментов опухоли;

(e) добавление первой популяции TIL в закрытую систему;

(f) выполнение первого размножения путем культивирования первой популяции TIL в культуральной среде для клеток, содержащей IL-2, с получением второй популяции TIL, причем первое размноже-

ние выполняют в закрытом контейнере, обеспечивающем первую газопроницаемую площадь поверхности, причем первое размножение выполняют в течение около 3-14 дней с получением второй популяции TIL, причем вторая популяция TIL в по меньшей мере 50 раз больше первой популяции TIL, и причем переход от этапа (e) к этапу (f) происходит без открытия системы;

(g) выполнение второго размножения путем добавления в культуральную среду для клеток второй популяции TIL дополнительных IL-2, OKT-3 и антигенпрезентирующих клеток (APC) с получением третьей популяции TIL, причем второе размножение выполняют в течение около 7-14 дней с получением третьей популяции TIL, причем третья популяция TIL представляет собой терапевтическую популяцию TIL, причем второе размножение выполняют в закрытом контейнере, обеспечивающем вторую газопроницаемую площадь поверхности, и причем переход от этапа (f) к этапу (g) происходит без открытия системы;

(h) сбор терапевтической популяции TIL, полученной на этапе (d), причем переход от этапа (d) к этапу (e) происходит без открытия системы; и

(i) перенос собранной популяции TIL с этапа (e) в инфузионный пакет, причем перенос с этапа (e) на (f) происходит без открытия;

(j) криоконсервацию инфузионного пакета, содержащего собранную популяцию TIL на этапе (f), с помощью процесса криоконсервации; и

(k) введение субъекту или пациенту терапевтически эффективной дозы третьей популяции TIL из инфузионного пакета на этапе (g).

В одном варианте осуществления изобретение обеспечивает способ лечения немелкоклеточной карциномы легкого (NSCLC) путем введения популяции инфильтрирующих опухоль лимфоцитов (TIL) пациенту, нуждающемуся в этом, причем способ включает:

(a) тестирование опухоли пациента на экспрессию PD-L1 и балл пропорции опухоли (TPS) PD-L1;

(b) тестирование пациента на отсутствие одной или более драйверных мутаций, причем драйверная мутация выбрана из группы, состоящей из мутации EGFR, вставки EGFR, мутации KRAS, мутации BRAF, мутации ALK, мутации c-ROS (мутация ROS1), слияния ROS1, мутации RET или слияния RET;

(c) определение того, что у пациента показатель TPS для PD-L1 составляет менее около 1%, и определение того, что у пациента также нет драйверных мутаций;

(d) получение первой популяции TIL из опухоли, резецированной у субъекта или пациента, путем обработки образца опухоли, полученного от субъекта, на множество фрагментов опухоли;

(e) добавление первой популяции TIL в закрытую систему;

(f) выполнение первого размножения путем культивирования первой популяции TIL в культуральной среде для клеток, содержащей IL-2, с получением второй популяции TIL, причем первое размножение выполняют в закрытом контейнере, обеспечивающем первую газопроницаемую площадь поверхности, причем первое размножение выполняют в течение около 3-14 дней с получением второй популяции TIL, причем вторая популяция TIL в по меньшей мере 50 раз больше первой популяции TIL, и причем переход от этапа (e) к этапу (f) происходит без открытия системы;

(g) выполнение второго размножения путем добавления в культуральную среду для клеток второй популяции TIL дополнительных IL-2, OKT-3 и антигенпрезентирующих клеток (APC) с получением третьей популяции TIL, причем второе размножение выполняют в течение около 7-14 дней с получением третьей популяции TIL, причем третья популяция TIL представляет собой терапевтическую популяцию TIL, причем второе размножение выполняют в закрытом контейнере, обеспечивающем вторую газопроницаемую площадь поверхности, и причем переход от этапа (f) к этапу (g) происходит без открытия системы;

(h) сбор терапевтической популяции TIL, полученной на этапе (d), причем переход от этапа (d) к этапу (e) происходит без открытия системы; и

(i) перенос собранной популяции TIL с этапа (e) в инфузионный пакет, причем перенос с этапа (e) на (f) происходит без открытия;

(j) криоконсервацию инфузионного пакета, содержащего собранную популяцию TIL на этапе (f), с помощью процесса криоконсервации; и

(k) введение субъекту или пациенту терапевтически эффективной дозы третьей популяции TIL из инфузионного пакета на этапе (g).

В другом варианте осуществления изобретение обеспечивает способ лечения субъекта, страдающего от рака, включающий введение субъекту терапевтически эффективной дозы терапевтической популяции TIL, описанной в настоящем документе.

В другом варианте осуществления изобретение обеспечивает способ лечения субъекта, страдающего от рака, включающий введение субъекту терапевтически эффективной дозы композиции TIL, описанной в настоящем документе.

В другом варианте осуществления изобретение обеспечивает описанный в настоящем документе способ лечения субъекта, страдающего от рака, модифицированный таким образом, что до введения терапевтически эффективной дозы описанной в настоящем документе терапевтической популяции TIL и композиции TIL, соответственно, субъекту назначали режим немиелоаблативной лимфодеплеции.

В другом варианте осуществления изобретение обеспечивает описанный в настоящем документе

способ лечения субъекта, страдающего от рака, модифицированный таким образом, что режим немиелоаблативной лимфодеплеции включает этапы введения циклофосфамида в дозе 60 мг/м^2/сутки в течение двух дней с последующим введением флударабина в дозе 25 мг/м^2/сутки в течение пяти дней.

В другом варианте осуществления изобретение обеспечивает описанный в настоящем документе способ лечения субъекта, страдающего от рака, модифицированный таким образом, что он дополнительно включает этап лечения субъекта со схемой с высокими дозами IL-2, начиная со дня после введения субъекту клеток TIL.

В другом варианте осуществления изобретение обеспечивает описанный в настоящем документе способ лечения субъекта, страдающего от рака, модифицированный таким образом, что схема с высокими дозами IL-2 включает введение 600000 или 720000 МЕ/кг в виде 15-минутной болюсной внутривенной инфузии каждые восемь часов до переносимости.

В другом варианте осуществления изобретение обеспечивает описанный в настоящем документе способ лечения субъекта, страдающего от рака, модифицированный таким образом, что рак представляет собой солидную опухоль.

В другом варианте осуществления изобретение обеспечивает описанный в настоящем документе способ лечения субъекта, страдающего от рака, модифицированный таким образом, что рак представляет собой меланому, рак яичников, рак шейки матки, немелкоклеточный рак легкого (NSCLC), рак легкого, рак мочевого пузыря, рак молочной железы, рак, вызванный вирусом папилломы человека, рак головы и шеи (включая плоскоклеточный рак головы и шеи (HNSCC)), глиобластому (включая GBM), рак желудочно-кишечного тракта, рак почки или почечно-клеточный рак.

В другом варианте осуществления изобретение обеспечивает описанный в настоящем документе способ лечения субъекта, страдающего от рака, модифицированный таким образом, что рак представляет собой меланому, HNSCC, рак шейки матки, NSCLC, глиобластому (включая GBM) и рак желудочно-кишечного тракта.

В другом варианте осуществления изобретение обеспечивает описанный в настоящем документе способ лечения субъекта, страдающего от рака, модифицированный таким образом, что рак представляет собой меланому.

В другом варианте осуществления изобретение обеспечивает описанный в настоящем документе способ лечения субъекта, страдающего от рака, модифицированный таким образом, что рак представляет собой HNSCC.

В другом варианте осуществления изобретение обеспечивает описанный в настоящем документе способ лечения субъекта, страдающего от рака, модифицированный таким образом, что рак представляет собой рак шейки матки.

В другом варианте осуществления изобретение обеспечивает описанный в настоящем документе способ лечения субъекта, страдающего от рака, модифицированный таким образом, что рак представляет собой NSCLC.

В другом варианте осуществления изобретение обеспечивает описанный в настоящем документе способ лечения субъекта, страдающего от рака, модифицированный таким образом, что рак представляет собой глиобластому (включая GBM).

В другом варианте осуществления изобретение обеспечивает описанный в настоящем документе способ лечения субъекта, страдающего от рака, модифицированный таким образом, что рак представляет собой рак желудочно-кишечного тракта.

В другом варианте осуществления изобретение обеспечивает описанный в настоящем документе способ лечения субъекта, страдающего от рака, модифицированный таким образом, что рак представляет собой гипермутированный рак.

В другом варианте осуществления изобретение обеспечивает описанный в настоящем документе способ лечения субъекта, страдающего от рака, модифицированный таким образом, что рак представляет собой гипермутированный детский рак.

В другом варианте осуществления изобретение обеспечивает описанную в настоящем документе терапевтическую популяцию TIL для применения в способе лечения субъекта, страдающего от рака, включающем введение субъекту терапевтически эффективной дозы терапевтической популяции TIL.

В другом варианте осуществления изобретение обеспечивает описанную в настоящем документе композицию TIL для применения в способе лечения субъекта, страдающего от рака, включающем введение субъекту терапевтически эффективной дозы композиции TIL.

В другом варианте осуществления изобретение обеспечивает описанную в настоящем документе терапевтическую популяцию TIL или описанную в настоящем документе композицию TIL, модифицированную таким образом, что до введения субъекту терапевтически эффективной дозы описанной в настоящем документе терапевтической популяции TIL или описанной в настоящем документе композиции TIL субъекту назначили режим немиелоаблативной лимфодеплеции.

В другом варианте осуществления изобретение обеспечивает описанную в настоящем документе терапевтическую популяцию TIL или композицию TIL, модифицированную таким образом, что режим немиелоаблативной лимфодеплеции включает этапы введения циклофосфамида в дозе 60 мг/м^2/сутки в

течение двух дней с последующим введением флударабина в дозе 25 мг/м^2/сутки в течение пяти дней.

В другом варианте осуществления изобретение обеспечивает описанную в настоящем документе терапевтическую популяцию TIL или композицию TIL, модифицированную таким образом, чтобы она дополнительно включала этап лечения пациента со схемой с высокими дозами IL-2, начиная со дня после введения пациенту клеток TIL.

В другом варианте осуществления изобретение обеспечивает описанную в настоящем документе терапевтическую популяцию TIL или композицию TIL, модифицированную таким образом, что схема с высокими дозами IL-2 включает введение 600000 или 720000 МЕ/кг в виде 15-минутной болюсной внутривенной инфузии каждые восемь часов до переносимости.

В другом варианте осуществления изобретение обеспечивает описанную в настоящем документе терапевтическую популяцию TIL или композицию TIL, модифицированную таким образом, что рак представляет собой солидную опухоль.

В другом варианте осуществления изобретение обеспечивает описанную в настоящем документе терапевтическую популяцию TIL или композицию TIL, модифицированную таким образом, что рак представляет собой меланому, рак яичников, рак шейки матки, немелкоклеточный рак легкого (NSCLC), рак легкого, рак мочевого пузыря, рак молочной железы, рак, вызванный вирусом папилломы человека, рак головы и шеи (включая плоскоклеточный рак головы и шеи (HNSCC)), глиобластому (включая GBM), рак желудочно-кишечного тракта, рак почки или почечно-клеточный рак.

В другом варианте осуществления изобретение обеспечивает описанную в настоящем документе терапевтическую популяцию TIL или композицию TIL, модифицированную таким образом, что рак представляет собой меланому, HNSCC, рак шейки матки, NSCLC, глиобластому (включая GBM) и рак желудочно-кишечного тракта.

В другом варианте осуществления изобретение обеспечивает описанную в настоящем документе терапевтическую популяцию TIL или композицию TIL, модифицированную таким образом, что рак представляет собой меланому.

В другом варианте осуществления изобретение обеспечивает описанную в настоящем документе терапевтическую популяцию TIL или композицию TIL, модифицированную таким образом, что рак представляет собой HNSCC.

В другом варианте осуществления изобретение обеспечивает описанную в настоящем документе терапевтическую популяцию TIL или композицию TIL, модифицированную таким образом, что рак представляет собой рак шейки матки.

В другом варианте осуществления изобретение обеспечивает описанную в настоящем документе терапевтическую популяцию TIL или композицию TIL, модифицированную таким образом, что рак представляет собой NSCLC.

В другом варианте осуществления изобретение обеспечивает описанную в настоящем документе терапевтическую популяцию TIL или композицию TIL, модифицированную таким образом, что рак представляет собой глиобластому.

В другом варианте осуществления изобретение обеспечивает описанную в настоящем документе терапевтическую популяцию TIL или композицию TIL, модифицированную таким образом, что рак представляет собой рак желудочно-кишечного тракта.

В другом варианте осуществления изобретение обеспечивает описанную в настоящем документе терапевтическую популяцию TIL или композицию TIL, модифицированную таким образом, что рак представляет собой гипермутированный рак.

В другом варианте осуществления изобретение обеспечивает описанную в настоящем документе терапевтическую популяцию TIL или композицию TIL, модифицированную таким образом, что рак представляет собой гипермутированный детский рак.

В другом варианте осуществления изобретение обеспечивает применение описанной в настоящем документе терапевтической популяции TIL в способе лечения рака у субъекта, включающем введение субъекту терапевтически эффективной дозы терапевтической популяции TIL.

В другом варианте осуществления изобретение обеспечивает применение композиции TIL, описанной в любом из предыдущих абзацев, в способе лечения рака у субъекта, включающем введение субъекту терапевтически эффективной дозы композиции TIL.

В другом варианте осуществления изобретение обеспечивает применение описанной в настоящем документе терапевтической популяции TIL или описанной в настоящем документе композиции TIL в способе лечения рака у пациента, включающем назначение пациенту режима немиелоаблативной лимфодеплеции, а затем введение субъекту терапевтически эффективной дозы терапевтической популяции TIL, описанной в любом из предыдущих абзацев, или описанной в настоящем документе терапевтически эффективной дозы композиции TIL.

1. Способы лечения рака на основе драйверных мутаций.

В контексте настоящего документа фразы "драйверная мутация" и/или "действующая мутация" и/или "онкогенная драйверная мутация" относятся к мутациям, которые обычно считаются онкогенными драйверами (т.е. стимуляторами рака или индукторами рака). Наличие одной или более из этих мутаций

традиционно применялось в качестве мишени для таргетной терапии. Часто драйверные мутации исследуют и/или анализируют для лечения таргетными терапевтическими препаратами, включая, например, ингибиторы тирозинкиназы (TKI). Такие драйверные мутации могут, в некоторых вариантах осуществления, воздействовать или влиять на ответ на терапевтическое лечение первой линии. Способы терапии и композиции TIL, описанные в настоящем документе, эффективны для лечения независимо от того, присутствуют или отсутствуют такие драйверные мутации у пациента или субъекта. Такие драйверные мутации можно тестировать и определять любым способом, известным в данной области техники, включая секвенирование всего экзома, или способы, направленные на обнаружение конкретной драйверной мутации.

В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой рак, который демонстрирует наличие или отсутствие одной или более драйверных мутаций. В некоторых вариантах осуществления рак демонстрирует наличие одной или более драйверных мутаций. В некоторых вариантах осуществления рак демонстрирует отсутствие одной или более драйверных мутаций. В некоторых вариантах осуществления анализировали на отсутствие или наличие одной или более драйверных мутаций. В некоторых вариантах осуществления одна или более драйверных мутаций отсутствуют. В некоторых вариантах осуществления лечение рака не зависит от наличия или отсутствия одной или более драйверных мутаций. В некоторых вариантах осуществления рак демонстрирует одну или более драйверных мутаций, выбранных из группы, состоящей из мутации EGFR, вставки EGFR, экзона 20 EGFR, мутации KRAS, мутации BRAF, мутации BRAF V600E, мутации BRAF V600K, мутации BRAF V600, мутации ALK, мутации c-ROS (мутация ROS1), слияния ROS1, мутации RET, слияния RET, мутации ERBB2, амплификации ERBB2, мутации BRCA, мутации MAP2K1, PIK3CA, CDKN2A, мутации PTEN, мутации UMD, мутации NRAS, мутации KRAS, мутации NF1, мутации MET, сплайсинга MET и/или измененной передачи сигналов MET, мутации TP53, мутации CREBBP, мутации KMT2C, мутации KMT2D, мутации ARID1A, мутации RB1, мутации ATM, мутации SETD2, мутации FLT3, мутации PTPN11, мутации FGFR1, мутации EP300, мутации MYC, мутации EZH2, мутации JAK2, мутации FBXW7, мутации CCND3 и мутации GNA11; В некоторых вариантах осуществления рак демонстрирует TPS PD-L1 менее 1% и имеет предопределенное отсутствие одной или более драйверных мутаций.

В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой рак, который не показан для лечения ингибитором EGFR, ингибитором BRAF, ингибитором ALK, ингибитором c-Ros, ингибитором RET, ингибитором ERBB2, ингибитором BRCA, ингибитором MAP2K1, ингибитором PIK3CA, ингибитором CDKN2A, ингибитором PTEN, ингибитором UMD, ингибитором NRAS, ингибитором KRAS, ингибитором NF1, ингибитором MET, ингибитором TP53, ингибитором CREBBP, ингибитором KMT2C, мутацией KMT2D, мутацией ARID1A, ингибитором RB1, ингибитором ATM, ингибитором SETD2, ингибитором FLT3, ингибитором PTPN11, ингибитором FGFR1, ингибитор EP300, ингибитором MYC, ингибитором EZH2, ингибитором JAK2, ингибитором FBXW7, ингибитором CCND3 и ингибитором GNA11.

В некоторых вариантах осуществления рак демонстрирует TPS PD-L1 менее 1% и не показан для лечения ингибитором EGFR, ингибитором BRAF, ингибитором ALK, ингибитором c-Ros, ингибитором RET, ингибитором ERBB2, ингибитором BRCA, ингибитором MAP2K1, ингибитором PIK3CA, ингибитором CDKN2A, ингибитором PTEN, ингибитором UMD, ингибитором NRAS, ингибитором KRAS, ингибитором NF1, ингибитором MET, ингибитором TP53, ингибитором CREBBP, ингибитором KMT2C, мутацией KMT2D, мутацией ARID1A, ингибитором RB1, ингибитором ATM, ингибитором SETD2, ингибитором FLT3, ингибитором PTPN11, ингибитором FGFR1, ингибитор EP300, ингибитором MYC, ингибитором EZH2, ингибитором JAK2, ингибитором FBXW7, ингибитором CCND3 и ингибитором GNA11.

В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой NSCLC, и мутация EGFR приводит к трансформации опухоли из NSCLC в мелкоклеточный рак легкого (SCLC).

В некоторых вариантах осуществления рак (или его биопсия) демонстрирует высокую мутационную нагрузку опухоли (высокая TMB; более 10 мут/кб) и/или высокий уровень микросателлитной нестабильности (высокая MSI). В некоторых вариантах осуществления рак (или его биопсия) демонстрирует высокую мутационную нагрузку опухоли (высокая TMB; более 10 мут/кб). В некоторых вариантах осуществления рак (или его биопсия) демонстрирует высокий уровень микросателлитной нестабильности (высокая MSI). Способы и системы для оценки мутационной нагрузки опухоли известны в данной области техники. Примеры раскрытия таких способов и систем можно найти в патенте США № 9792403, публикации заявки на патент США № US 2018/0363066 A1, публикации международной заявки на патент № WO 2013/070634 A1 и WO 2018/106884 A1, а также в публикации Metzker, Nature Biotechnol. Rev. 2010, 11, 31-46, каждая из которых включена в настоящий документ посредством ссылки.

В некоторых вариантах осуществления мутация EGFR включает, например, помимо прочего, T790M, Ex19Del, L858R, вставку экзона 20, delE709-T710insD, I744_K745insKIPVAI, K745_E746insTPVAIK, E709X, E709K, E709A, делецию экзона 18, G719X, G719A, G719S, L861Q, S768I, L747P, A763_764insFQEA, D770_N771insNPG, A763_764insFQEA, P772_H773insDNP вставку экзона 20, H773_V774insNPH вставку экзона 20, S768I, D770_N771insSVD, V769_D770InsASV, p.K745_E746insIPVAIK, p.K745_E746insTPVAIK, p.I744_K745insKIPVAI, D770_N771insNPG,

P772_H773insPNP, A763_Y764insFQEA и/или дублирование домена киназы EGFR (EGFR-KDD). В некоторых вариантах осуществления мутация EGFR выбрана из группы, состоящей из T790M, Ex19Del, L858R, вставки экзона 20, delE709-T710insD, I744_K745insKIPVAI, K745_E746insTPVAIK, E709X, E709K, E709A, делеции экзона 18, G719X, G719A, G719S, L861Q, S768I, L747P, A763_764insFQEA, D770_N771insNPG, A763_764insFQEA, P772_H773insDNP вставки экзона 20, H773_V774insNPH вставки экзона 20, S768I, D770_N771insSVD, V769_D770InsASV, p.K745_E746insIPVAIK, p.K745_E746insTPVAIK, p.I744_K745insKIPVAI, D770_N771insNPG, P772_H773insPNP, A763_Y764insFQEA и дублировании домена киназы EGFR (EGFR-KDD).

В некоторых вариантах осуществления мутация EGFR представляет собой двойную мутацию, включая, помимо прочего, L858R/T790M, Ex19Del/T790M, G719X/L861Q, G719X/S768I (или S768I/G719X), S768I/L858R, L858R/E709A и /или E746_T751delinsA+T790M. В некоторых вариантах осуществления мутация EGFR представляет собой двойную мутацию, выбранную из группы, состоящей из L858R/T790M, Ex19Del/T790M, G719X/L861Q, G719X/S768I (или S768I/G719X), S768I/L858R, L858R/E709A и E746_T751delinsA+T790M. Дополнительные свойства и способы, касающиеся мутаций EGFR, представлены в публикации международной патентной заявки № WO 2010/020618 A1, которая включена в настоящий документ посредством ссылки.

В некоторых вариантах осуществления мутация ALK включает, помимо прочего, вариант 1 EML4-ALK (AB274722.1; BAF73611.1), вариант 2 EML4-ALK (AB275889.1; BAF73612.1), вариант 3a EML4-ALK (AB374361.1; BAG55003.1), вариант 3b EML4-ALK (AB374362.1; BAG55004.1), вариант 4 EML4-ALK (AB374363.1; BAG75147.1), вариант 5a EML4-ALK (AB374364.1; BAG75148.1), вариант 5b EML4-ALK (AB374365.1; BAG75149.1), вариант 6 EML4-ALK (AB462411.1; BAH57335.1), вариант 7 EML4-ALK (AB462412.1; BAH57336.1), KIF5B-ALK (AB462413.1; BAH57337.1), NPM-ALK, TPM3-ALK, TFGXL-ALK, TEGL-ALK, TFGS-ALK, A11C-ALK, CLTC-ALK, MSN-ALK, TPM4-ALK, MYH9-ALK, RANBP2-ALK, AL017-ALK и CARS-ALK (см., например, Pulford et al., (2004) J. Cell. Physiol. 199:330-358). Кроме того, специалисту в данной области техники будет понятно, что варианты киназы ALK могут возникать в зависимости от конкретного события слияния между киназой ALK и ее партнером по слиянию (например, EML4 может сливаться с по крайней мере экзоном 2, 6a, 6b, 13, 14 и/или 15, как описано, например, в публикации Horn and Pao, J. Clin. Oncol. 2009, 27, 4247-4253, описание которой включено в настоящий документ посредством ссылки.

Дополнительные примеры мутаций ALK описаны в патентах США № 9018230 и 9458508, описание которых включено в настоящий документ посредством ссылки.

В некоторых вариантах осуществления мутация ROS1 по настоящему изобретению представляет собой слияние ROS1, причем часть полипептида ROS1, которая включает киназный домен белка ROS1 (или полинуклеотид, кодирующий его), слита со всем или частью другого полипептида (или полинуклеотида, кодирующего его) и причем название этого второго полипептида или полинуклеотида указано в слиянии. В некоторых вариантах осуществления мутация ROS1 определяется как слитый белок ROS1 (например, с помощью IHC) и/или слитый ген ROS (например, с помощью FISH) и/или мРНК ROS1 (например, с помощью количественной RT-PCR), что предпочтительно указывает на слитый белок ROS1, выбранный из группы, состоящей из SLC34A2-ROS1 (экзоны 13del2046 и 4 SLC34A2, слитые с экзонами 32 и 34 ROS1), CD74-ROS1 (экзон 6 CD74, слитый с экзонами 32 и 34 ROS1), EZR-ROS1 (экзон 10 EZR, слитый с экзоном 34 ROS1), TPM3-ROS1 (экзон 8 TPM3, слитый с экзоном 35 ROS1), LRIG3-ROS1 (экзон 16 LRIG3, слитый с экзоном 35 ROS1), SDC4-ROS1 (экзоны 2 и 4 SDC4, слитые с экзоном 32 ROS1, и экзон 4 SDC4, слитый с экзоном 34 ROS1), GOPC-ROS1, также известный как FIG-ROS1, (экзон 8 GOPC, слитый с экзоном 35 ROS1, и экзон 4 GOPC, слитый с экзоном 36 ROS1) и G2032R, также известный как ROS1G2032R.

Дополнительные описания мутаций ROS1 и слияния ROS были представлены в публикациях патентных заявок США № US 2010/0221737 A1, US 2015/0056193 A1 и US 2010/0143918 A1, а также в публикации международной патентной заявки № WO 2010/093928 A1, каждая из которых включена в настоящий документ посредством ссылки. В некоторых вариантах осуществления мутация RET представляет собой слияние RET или точечную мутацию.

В некоторых вариантах осуществления точечная мутация RET включает, помимо прочего,

H6650, K666E, K666M, S686N, G691S, R694Q, M700L, V706M, V706A, E713K, G736R, G748C, A750P, S765P, P766S, E768Q, E768D, L769L, R770Q, D771N, N777S, V7781, Q781R, L790F, Y791F, Y791N, V804L, V804M, V804E, E805K, E806C, Y806E, Y806F, Y806S, Y806G, Y806C, E818K, S819I, G823E, Y826M, R833C, P841L, P841P, E843D, R844W, R844Q, R844L, M848T, 1852M A866W, R873W, A876V, L881V, A883F, A883S, A883T, E884K, R886W, S891A, R8970, D898V, E901K, 5904F, S904C2, K907E, K907M, R908K, G911D, R912P, R912Q M918T, M918V, M918L6, A919V, E921K, S922P, S922Y, T930M, F961L, R972G, R982C, M1009V, D1017N, V10416 и M1064T.

В некоторых вариантах осуществления слияние RET представляет собой слияние между RET и партнером по слиянию, выбранным из группы, состоящей из

BCR, BCR, CLIP 1, KIFSB, CCDC6, PTClex9, NCOA4, TRIM33, ERC1, FGFRIOP, MBD1, RAB61P2, PRKARIA, TRIM24, KTN1, GOLGA5, HOOK3, KIAA1468, TRIM27, AKAP13, FKBP15, SPECCIL, TBL1XR1, CEP55, CUX1, ACBD5, MYH13, PIBF1, KIAA1217 и MPRIP.

Дополнительные описания мутаций RET представлены в патенте США № 10035789, который полностью включен в настоящий документ посредством ссылки.

В некоторых вариантах осуществления мутация BRAF представляет собой мутацию BRAF V600E/K. В других вариантах осуществления мутация BRAF представляет собой мутацию, отличную от V600E/K.

В некоторых вариантах осуществления мутация BRAF, отличная от V600E/K, представляет собой мутацию, активируемую киназой, мутацию с нарушением киназы или мутацию, не связанную с киназой, и их комбинации. В некоторых вариантах осуществления мутация, активируемая киназой, выбрана из группы, состоящей из R4621, 1463S, G464E, G464R, G464V, G466A, G469A, N58, E586K, F595L, L597Q, L597R, L5975, L597V, A598V, T599E, V600R, K601E, 5602D, A728V и их комбинаций. В некоторых вариантах осуществления мутация с нарушением киназы выбрана из группы, состоящей из G466E, G466R, G466V, Y472C, K483M, D594A, D594E, D594G, D594H, D594N, D594V, G596R, T599A, 5602A и их комбинаций. В некоторых вариантах осуществления мутация, не связанная с киназой, выбрана из группы, состоящей из T4401, 5467L, G469E, G469R, G4695, G469V, L584F, L588F, V600 K6OldelinsE, 56051, Q609L, E611Q и их комбинаций. В некоторых вариантах осуществления мутация BRAF, отличная от V600E/K, выбрана из группы, состоящей из дупликации D594, G469, K601E, L597, T599, L485W, F247L, G466V, слияния BRAF, реаранжировки BRAF-AGAP3, варианта среза экзона 15 BRAF и их комбинаций.

В некоторых вариантах осуществления мутация Met включает точечную мутацию, делеционную мутацию, инсерционную мутацию, инверсию, аберрантный сплайсинг, миссенс-мутацию или увеличение гена, что вызывает повышение по меньшей мере одной биологической активности белка c-Met, тирозинкиназной активности, такой как улучшенная, димеризация гомолога рецептора, связывание лиганда образования, усиление тела и гетеродимера и т.д. Мутация Met может быть локализована в любой части генов c-Met. В одном варианте осуществления мутация находится в киназном домене белка c-Met, кодируемого геном c-MET. В некоторых вариантах осуществления мутации c-Met представляют собой точечные мутации в N375, V13, V923, R175, V136, L229, S323, R988, S1058/T1010 и E168.

В некоторых вариантах осуществления мутация ERBB2 представляет собой точечную мутацию в аминокислотной последовательности ERBB2. В некоторых вариантах осуществления точечная мутация ERBB2 представляет собой мутацию, которая вызывает аминокислотные замены, вызывает сплайсинг мРНК или представляет собой точечную мутацию в вышестоящей области. Причем указанная мутация включает нуклеотидную мутацию, вызывающую по меньшей мере одну аминокислотную замену, выбранную из группы, состоящей из Q568E, P601R, I628M, P885S, R143Q, R434Q и E874K.

В некоторых вариантах осуществления мутация ERBB2 представляет собой амплификацию ERBB2. В некоторых вариантах осуществления амплификация ERBB2 включает точечную мутацию, выбранную из группы, состоящей из V659E, G309A, G309E, S310F, D769H, D769Y, V777L, P780ins, P780-Y781insGSP, V842I, R896C, K753E и L755S, и может быть обнаружена с помощью полимеразной цепной реакции или других методов секвенирования, известных в данной области техники, таких как методы, описанные в публикации Bose, et al., Cancer Discov. 2013, 3(2), 224-237; и публикации Zuo, et al. Clin Cancer Res. 2016, 22(19), 4859-4869, описание которых включено в настоящий документ посредством ссылки.

В некоторых вариантах осуществления мутация BRCA представляет собой мутацию в BRCA1 и/или BRCA2, предпочтительно в BRCA1, и/или в одном или более других генах, белковый продукт которых ассоциирован с BRCA1 и/или BRCA2 в местах повреждения ДНК, включая ATM, ATR, Chk2, H2AX, 53BP1, NFBD1, Mre11, Rad50, нибрин, BRCA1-ассоциированный домен RING (BARD1), Abraxas и MSH2. Мутация в одном или более из этих генов может привести к паттерну экспрессии генов, который имитирует мутацию в BRCA1 и/или BRCA2.

В некоторых вариантах осуществления мутация BRCA включает несинонимичную мутацию. В некоторых вариантах осуществления мутация BRCA включает нонсенс-мутацию. В некоторых вариантах осуществления мутация BRCA включает мутацию со сдвигом рамки считывания. В некоторых вариантах осуществления мутация BRCA включает мутацию сплайсинга. В некоторых вариантах осуществления мутация BRCA экспрессируется в виде мутантной мРНК и, в конечном счете, мутантного белка. В некоторых вариантах осуществления белок BRCA1/2 является функциональным. В других вариантах осуществления белок BRCA1/2 имеет пониженную активность. В других вариантах осуществления белок BRCA1/2 является нефункциональным.

Применяемый в настоящем документе в отношении замен знак "=" в отношении мутаций обычно

относится к синонимичным заменам, молчащим кодонам и/или молчащим заменам. В частности, синонимичная замена (также называемая молчащей заменой или молчащим кодоном) относится к замене одного нуклеотидного основания на другое в экзоне гена, кодирующего белок, причем полученная аминокислотная последовательность не модифицирована. Это связано с тем, что генетический код является "вырожденным", то есть некоторые аминокислоты кодируются более чем одним кодоном из трех пар оснований. Поскольку некоторые кодоны для данной аминокислоты отличаются всего на одну пару оснований от других, кодирующих ту же аминокислоту, точечная мутация, которая заменяет основание дикого типа одним из альтернативных вариантов, приведет к включению той же самой аминокислоты в удлинение полипептидной цепи во время трансляции гена. В некоторых вариантах осуществления синонимичные замены и мутации, влияющие на некодирующую ДНК, часто считаются молчащими мутациями; однако не всегда мутация протекает молчаливо и без какого-либо воздействия. Например, синонимичная мутация может влиять на транскрипцию, сплайсинг, транспорт мРНК и трансляцию, любое из которых может изменить результирующий фенотип, делая синонимическую мутацию не молчащей. Субстратная специфичность тРНК к редкому кодону может влиять на время трансляции и, в свою очередь, на котрансляционное сворачивание белка. Это проявляется в предпочтении кодонов, которое наблюдается у многих видов. Несинонимичная замена/мутация приводит к изменению аминокислоты, которое может быть условно классифицировано как консервативное (замена аминокислотой с аналогичными физико-химическими свойствами), полуконсервативное (например, отрицательно заряженная аминокислота на положительно заряженную) или радикальное (значительно отличающаяся от других аминокислота). В некоторых вариантах осуществления мутация BRCA представляет собой мутацию BRCA1, которая включает, помимо прочего,

P871L, K1183R, D693N, S1634G, E1038G, S1040N, S694= (=: молчащий кодон), M1673I, Q356R, S1436=, L771=, K654Sfs*47, S198N, R496H, R841W, R1347G, H619N, S1533I, L30=, A622V, Y655Vfs*18, R496C, E597K, R1443*, E23Vfs*17, L30F, E111Gfs*3, K339Rfs*2, L512F, D693N, P871S, S1140G, Q1240*, P1770S, R7=, L52F, T176M, A224S, L347=, S561F, E597*, K820E, K893Rfs*107, E962K, M1014I, R1028H, E1258D, E1346K, R1347T, L1439F, H1472R, Q1488*, S1572C, E1602K, R1610C, L1621=, Q1625*, Q1625=, D1754N, R1772Q, R1856*

и любую их комбинацию.

В некоторых вариантах осуществления мутация BRCA представляет собой мутацию BRCA2, которая включает, помимо прочего,

V2466A, N289H, N991D, S455= (=: молчащий кодон), N372H, H743=, V1269=, S2414=, V2171=, L1521=, T3033Nfs*11, K1132=, T3033Lfs*29, R2842C, N1784Tfs*7, K3326*, K3326*, D1420Y, I605Yfs*9, I3412V, A2951T, T3085Nfs*26, R2645Nfs*3, S1013*, T1915M, F3090=, V3244I, A1393V, R2034C, L1356=, E2981Rfs*37, N1784Kfs*3, K3416Nfs*11, K1691Nfs*15, S1982Rfs*22

и любую их комбинацию.

В некоторых вариантах осуществления мутация NRAS включает, помимо прочего,

E63K, Q61R, Q61K, G12D, G13D, Q61R, Q61L, Q61K, G12S, G12C, G13R, Q61H, G12V, G12A, Q61L, G13V, Q61H, Q61H, G12R, G13C, Q61P, G13S, G12D, G13A, G13D, A18T, Q61X, G60E, G12S, Q61= (=: молчащий кодон), Q61E, Q61R, A146T, A59T, A59D, Q61=, R68T, A146T, G12A, E62Q, G75=, A91V

и любую их комбинацию.

E132K В некоторых вариантах осуществления мутация PIK3CA включает замещающие мутации, делеционные мутации и инсерционные мутации. В некоторых вариантах осуществления мутации происходят в спиральном домене PIK3CA и в его киназе. В других вариантах осуществления в домене P85BD PIK3CA. В некоторых вариантах осуществления мутация PIK3CA происходит в экзонах 1, 2, 4, 5, 7, 9, 13, 18 и 20. В некоторых вариантах осуществления мутация PIK3CA происходит в экзонах 9 и 20. В других вариантах осуществления мутация PIK3CA представляет собой комбинацию любых мутаций, перечисленных выше. Можно протестировать любую комбинацию этих экзонов необязательно в сочетании с тестированием других экзонов. Тестирование на наличие мутаций может проводиться по всей кодирующей последовательности или может быть сосредоточено на областях, где мутации группируются. Особые очаги мутаций возникают в положениях нуклеотидов 1624, 1633, 1636 и 3140 кодирующей последовательности PIK3CA.

В некоторых вариантах осуществления размер мутации PIK3CA невелик и составляет от 1 до 3 нук-

леотидов. В некоторых вариантах осуществления мутации PIK3CA включают, помимо прочего, G1624A, G1633A, C1636A, A3140G, G113A, T1258C, G3129T,

C3139T, E542K, E545K, Q546R, H1047L, H1047R и G2702T.

В некоторых вариантах осуществления мутация MAP2K1 представляет собой соматическую мутацию MAP2K1, необязательно мутацию MAP2K1, которая повышает уровень MEK1. В некоторых вариантах осуществления мутация MAP2K1 представляет собой мутацию в одном или более генах, связанных с путем RAS/MAPK, включающую: HRAS, KRAS, NRAS, ARAF, BRAF, RAF1, MAP2K2, MAPK1, MAPK3, MAP3K3. В некоторых вариантах осуществления мутация MAP2K1 находится в одном или более генах, выбранных из группы, состоящей из RASA, PTEN, ENG, ACVRL1, SMAD4, GDF2 или их комбинаций.

В некоторых вариантах осуществления мутация MAP2K1 включает, помимо прочего,

P124S, Q56P, K57N, E203K, G237*, P124L, G128D, D67N, K57E, E102_I103del,

C121S, K57T, K57N, Q56P, P124L, K57N, G128V, Q58_E62del, F53L, I126=, I103_K104del и

любую их комбинацию.

В некоторых вариантах осуществления мутация KRAS включает несинонимичную мутацию. В некоторых вариантах осуществления мутация KRAS включает нонсенс-мутацию. В некоторых вариантах осуществления мутация KRAS включает мутацию со сдвигом рамки считывания. В некоторых вариантах осуществления мутация KRAS включает мутацию сплайсинга. В некоторых вариантах осуществления мутация KRAS экспрессируется в виде мутантной мРНК и, в конечном счете, мутантного белка. В некоторых вариантах осуществления мутантный белок KRAS является функциональным. В других вариантах осуществления мутантный белок KRAS имеет пониженную активность. В других вариантах осуществления мутантный белок KRAS является нефункциональным.

В некоторых вариантах осуществления мутация KRAS включает, помимо прочего,

G12D, G12V, G13D, G12C, G12A, G12S, G12R, G13C, Q61H, A146T, Q61R, Q61H, Q61L,

G13S, A146V, Q61K, G13R, G12F, K117N, G13A, G13V, A59T, V14I, K117N, Q22K, Q61P,

A146P, G13D, L19F, L19F, Q61K, G12V, G60=, G12=, G13=, A18D, T58I, Q61E, E63K, G12L,

G13V, A59G, G60D, G10R, G10dup, D57N, A59E, , V14G, D33E, G12I, G13dup

и любую их комбинацию, где=указывает на кодирование молчания.

В некоторых вариантах осуществления мутация NF1 включает замещающие мутации, делеционные мутации, миссенс-мутации, аберрантные мутации сплайсинга и инсерционные мутации. В некоторых вариантах осуществления мутация NF1 представляет собой мутацию с потерей функции (LOF). В некоторых вариантах осуществления мутация NF1 выбрана из группы, состоящей из R1947X (C5839T), R304X, мутации экзона 37, мутации экзона 4b, мутации экзона 7, мутации экзона 10b и мутации экзона 10c (например, 1570GDT, E524X).

В некоторых вариантах осуществления мутация CDKN2A включает, помимо прочего,

R24P, D108G, D108N, D108Y, G125R, P114L, R80*, R58*, H83Y, W110*, P114L,

E88*, W110*, E120*, D108Y, D84Y, D84N, E69*, P81L, Q50*, L78Hfs*41, D108N, S12*,

P48L, E61*, Y44*, E88K, R80*, D84G, L16Pfs*9, Y129*, D108H, A148T, A36G, A102V,

W15*, H83R, A57V, E33*, D74Y, A76V, E153K, D74N, H83D, V82M, R58*, Y129*, E119*,

Y44*, D74A, T18_A19dup, Y44Lfs*76, L32_L37del, V28_E33del, D14_L16del, A68T или

любую их комбинацию.

В некоторых вариантах осуществления мутация PTEN включает несинонимичную мутацию. В некоторых вариантах осуществления мутация PTEN включает нонсенс-мутацию. В некоторых вариантах осуществления мутация PTEN включает мутацию со сдвигом рамки считывания. В некоторых вариантах осуществления мутация PTEN включает мутацию сплайсинга. В некоторых вариантах осуществления мутантный PTEN экспрессируется в виде мРНК и, в конечном счете, белка. В некоторых вариантах осуществления мутантный белок PTEN является функциональным. В других вариантах осуществления мутантный белок PTEN имеет пониженную активность. В других вариантах осуществления мутантный белок PTEN является нефункциональным. В некоторых вариантах осуществления мутация PTEN включает, помимо прочего,

R130Q, R130G, T319*, R233*, R130*, K267Rfs*9, N323Mfs*21, N323Kfs*2, R173C, R173H, R335*, Q171*, Q245*, E7*, D268Gfs*30, R130Q, Q214*, R130L, C136R, Q298*, Q17*, H93R, P248Tfs*5, I33del, R233*, E299*, G132D, Y68H, T319Kfs*24, N329Kfs*14, V166Sfs*14, V290*, T319Nfs*6, R142W, P38S, A126T, H61R, F278L, S229*, R130P, G129R, R130Qfs*4, P246L, R130*, G165R, C136Y, R173C, I101T, Y155C, D92E, K164Rfs*3, N184Efs*6, G129E, R130G, G36R, F341V, H123Y, C124S, M35VG127E, G165E

и любую их комбинацию.

В некоторых вариантах осуществления мутация TP53 включает, помимо прочего, R175H, G245S, R248Q, R248W, R249S, R273C, R273H, R282W, C135Y, C141Y, P151S, V157F, R158L, Y163C, V173L, V173M, C176F, H179R, H179Y, H179Q, Y205C, Y220C, Y234C, M237I, C238Y, S241F, G245D, G245C, R248L, R249M, V272M, R273L, P278L, R280T, E285K, E286K, R158H, C176Y, I195T, G214R, G245V, G266R, G266E, P278S, R280K

или любую их комбинацию. В некоторых дополнительных вариантах осуществления мутация TP53 выбрана из группы, состоящей из: G245S; R249S; R273C; R273H; C141Y, V157F, R158L, Y163C, V173L, V173M, Y205C, Y220C, G245C, R249M, V272M, R273L и E286K. В некоторых вариантах осуществления мутация TP53 включает одну или более мутаций, указанных выше.

В некоторых вариантах осуществления мутация CREBBP включает, помимо прочего, R1446C, R1446H, S1680del, I1084Sfs*15, P1948L, I1084Nfs*3, ?R386*, S893L, R1341*, P1423Lfs*36, P1488L, Y1503H, R1664C, A1824T, R1173*, R1360*, Y1450C, H2228D, S71L, P928=, D1435N, W1502C, Y1503D, R483*, R601Q, S945L, R1103*, R1288W, R1392*, C1408Y, D1435G, R1446L, H1485Y, Q1491K, Q96*, L361M, L524Wfs*6, Q540*, Q1073*, A1100V, R1169C, C1237Y, R1347W, G1411E, W1472C, I1483F, P1488T, R1498*, Y1503F, Q1856*, R1985C, R2104C, S2328L, V2349=, S2377L

ли любую их комбинацию.

В некоторых вариантах осуществления мутация KMT2C включает, помимо прочего, D348N, P350=, R380L, C391*, P309S, C988F, Y987H, S990G, K2797Rfs*26, V346=, R894Q, R284Q, S806=, R1690=, P986=, A1685S, G315S, Q755*, R909K, T316S, S772L, G838S, L291F, P335=, C988F, Q2680=, E765G, K339N, Y816*, R526P, N729D, G845E, I817Nfs*11, G892R, C1103*, S3660L, F4496Lfs*21, G315C, R886C, D348N, S793=, V919L, R2481S, R2884*, R4549C, M305Dfs*28, T316S, P377=, I455M, T820I, S965=, S730Y, P860S, Q873Hfs*40, R904*, R2610Q, R4478*

и любую их комбинацию.

В некоторых вариантах осуществления мутация KMT2D включает, помимо прочего, L1419P, E640D, E541D, E455D, T2131P, K1420R. P2354Lfs*30, G2493=, Q3612=, I942=, T1195Hfs*17, P4170=, P1194H, G1235Vfs*95, P4563=, P647Hfs*283, L449_P457del, P3557=, Q3603=, R1702*, P648Tfs*2, R5501*, R4198*, R4484*, R83Q, R1903*, ,R2685* , R4282*, L5326=, R5432W, R2734*, Q2800*, R2830*, Q3745dup, S4010P, R4904*, G5182Afs*61, R5214H, R1615*, Q2380*, R2687*, R2771*, V3089Wfs*30, Q3799Gfs*212, R4536*, R5030C, R5048C, R5432Q, A221Lfs*40, A476T, A2119Lfs*25,P2557L, R2801*, Q3913*, R4420W, G4641=, R5097*

и любую их комбинацию.

В некоторых вариантах осуществления мутация ARID1A включает, помимо прочего, например, субъект имеет мутацию ARID1A, выбранную из группы, состоящей из C884* (*: нонсенс-мутация), E966K, Q1411*, F1720fs (fs: сдвиг рамки считывания), G1847fs, C1874fs, D1957E, Q1430, R1721fs, G1255E, G284fs, R1722*, M274fs, G1847fs, P559fs, R1276*, Q2176fs, H203fs, A591fs, Q1322*, S2264*, Q586*, Q548fs и N756fs.

В некоторых вариантах осуществления мутация RB1 включает, помимо прочего,

R320X, R467X, R579X, R455X, R358X, R251X, R787X, R552X, R255X, R556X, Y790X, Q575X, E323X, R661W, R579*, R455*, R556*. R787*, R661W, R445*, R467*, Q217* ,Q471*, W195*, Q395*, I680T, E137*, R255*, Q344*, Q62*, E440K, A488V, P777Lfs*33, E322K, R656W, G617Rfs*36, C221*, E440*,Q93*, Q504*, E125*, S834*, E323*, Q685*, S829*, W516*, G435*, Q257*, E79*, S567L, V654M, V654Sfs*14,G100Efs*11, K715*

и любую их комбинацию.

В некоторых вариантах осуществления мутация ATM представляет собой мутацию в последовательности гена ATM, включая, помимо прочего,

10744A>G;10744A>G; 11482G>A; IVS3-558A>T; 146C>G; 381delA; IVS8-3delGT; 1028delAAAA; 1120C>T; 1930ins16; IVS16+2T>C; 2572T>C; IVS21+1G>A; 3085delA; 3381delTGAC; 3602delTT; 4052delT; 4396C>T; 5188C>T; 5290delC; 5546delT; 5791G>CCT; 6047A>G; IVS44-1G>T; 6672delGC/6677delTACG; 6736dell 1/6749del7; 7159insAGCC; 7671delGTTT; 7705del14; 7865C>T; 7979delTGT; 8177C>T; 8545C>T; 8565T>A; IVS64+1G>T и 9010del28.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения мутация SETD2 представляет собой изменение в последовательности гена, кодирующего белок SETD2, когда положение кодона инициации транскрипции в последовательности мРНК с общедоступным номером NCBI NM_014159 установлено на 1. В некоторых вариантах осуществления 7558-й G (гуанин) заменен на T (тимин), 4774-й C (цитозин) заменен на T, 1210-й A (аденин) заменен на T, 4883-й T заменен на G, 5290-й C заменен на T, 7072-й C заменен на T, 4144-й G заменен на T, 1297-й C заменен на T, 755-й T заменен на G, 7261-й T заменен на G, 6700 заменен на T, 2536-й C заменен на T, 7438-й C заменен на замену T или имеется вставка A в положении 3866, вставка T в положении 6712, вставка T в положении 7572, делеция 913-го A, делеция 5619-го C, делеция оснований 4603-4604, делеция 1-го основания, делеция 1936-го C, делеция оснований 3094-3118, вставка A в 5289-е положение и делеция оснований 6323-6333.

В некоторых вариантах осуществления мутация FLT3 включает, помимо прочего,

(Q569_E648)ins, D835X, (Q569_E648)delins, (D835_I836), D835Y, D835V, D835Y, D835H, T227M, I836del, N676K, D835E, Y597_E598insDYVDFREY, D835E, D835del, F594_D600dup, A680V, D839G, D96=, D835H, V491L, D835E, Q989*, D835V, L561=, I836del, P986Afs*27, D7G, D324N, S451F, D835N, L576P, Y597_E598insDVDFREY, V491L, N841T, D324N, Y572C, R595_L601dup, K663R, N676K, F691L, D835A, I836H, N841K, S993L, L832F, I836M, A66V

и любую их комбинацию.

В некоторых вариантах осуществления мутация PTPN11 включает, помимо прочего,

с E76K, A72V, A72T, D61Y, D61V, ,G60V , E69K, E76G, G507V, S506L, G507A, T73I, E76A, E76Q, S506P, D61N, F71L, E76V, F71L, A72D, V432M, T472M, P495L, N58Y, F285S, S506A, S189A, A465T, R502W, G507R, T511K, D61H, D61G, G507E, G60R, G60A, Q514L, E139D, Y197*, N308D, Q514H, Q514H, N58S, E123D, L206=, A465G, P495S, G507R

и любую их комбинацию.

В некоторых вариантах осуществления мутация FGFR1 включает, помимо прочего,

N577K, K687E, N577K, D166del, T371M, R476W, T350=, E498K, N577D, D683G, R87C, A154D, N303=, A374V, D550=, S633=, V695L, G728=, R765W, P803S, W19C, P56=, R113C, V149I, S158L, D166dupR220C, N224Kfs*8, D249N, R281W, R281Q, A299S, S424L, S461F, S467F, R506Q

и любую их комбинацию.

В некоторых вариантах осуществления мутация EP300 включает, помимо прочего,

D1399N, Y1414C, M1470Cfs*26, Y1111*, H2324Pfs*55, R1627W, N2209_Q2213delinsK, Q2268del, L415P, M1470Nfs*3, E1514K, C1201Y, P1452L, S952*, C1164Y, D1399Y, S507G, Q824*, D1507N, H2324Tfs*29, P925T, P1440L, W1466C, P1502L, A1629V, R1645*, N1700Tfs*9, P1869L, Q65*, A171V, R202*, R580Q, A627V, Q1082*, N1236Kfs*2, N1286S, R1312*, R1356*, C1385F, H1451L, R1462*, Y1467N, Y1467H, R1478H, R1627Q, R86*, R370H, R397*, R754C, P842S, I997V, E1014*

и любую их комбинацию.

В некоторых вариантах осуществления мутация MYC включает, помимо прочего,

E61T, E68I, R74Q, R75N, W135E, W136E, V394D, L420P, W96E, V325D, L351P, белок MYC с делецией 41 аминокислоты на N-конце (dN2MYC), N26S, S161L, P74L, V7M, F153S, E54D, P246, L164V, P74S, A59V, T73I, P72T, T73A, H374R, P17S, T73N, S264N, P72S, Q52del, S21T, P74A, S107N, P75S, S77P, P261S, P74Q, S190R, A59T, F153C, P75H, T73I, S77F, N11S, S21N, P78L, P72L, N9K, S190N, S267F, T73P, P78S, G105D, S187C, L71M, Q10H, L191x, Q50x, L191F, R25K, F130L, Y27S, D195N, D2G, V20A, V6G, V20I, D2H, P75A, G152D, P74T, C40Y, E8K, Q48x

и любую их комбинацию.

В некоторых вариантах осуществления мутация EZH2 связана с измененными паттернами метилирования гистонов. В некоторых вариантах осуществления мутация EZH2 приводит к превращению аминокислоты Y641 (эквивалентной Y646, каталитическому домену) в F, N, H, S или C, что приводит к гипертриметилированию H3K27 и запускает лимфогенез. В некоторых вариантах осуществления мутация EZH2 включает мутации SET-домена EZH2, сверхэкспрессию EZH2, сверхэкспрессию других субъединиц PRC2, мутации с потерей функции гистоновых ацетилтрансфераз (HAT) и потерю функции MLL2. Клетки, гетерозиготные по мутации EZH2 Y646, приводят к гипертриметилированию H3K27 в сравнении с клетками, гомозиготными по белку EZH2 дикого типа (WT), или клетками, гомозиготными по мутации Y646.

В некоторых вариантах осуществления мутация EZH2 включает, помимо прочего,

Y646F, Y646N, D185H, Y646F, Y646S, Y646H, R690H, Y646X, E745K, Y646C, V626M, V679M, R690H, R684H, A682G, E249K, G159R, R288Q, N322S, A692V, R690C, D730* (сдвиг рамки считывания, обусловленный вставкой), S695L, R684C, M667T, R288*, S644*, D192N, K550T, Q653E, D664G, R347Q, Y646C, G660R, R213C, A255T, S538L, N693K, I55M, R561H, A692V, K515R, Y733*, R63*, Q570*, Q328*, R25Q, T467P A656V, T573I, C571Y, E725K, R16W, P577L, F145S, V680M, G686D, G135R, K634E, S652F, R298C, G648E, R566H, L149R, R502Q, Y731D, R313W, N675K, S652C, T374Hfs*3, N152Ifs*15, E401Kfs*22, K406Mfs*17, E246*, S624C, I146T, V626M, L674S, H694R, A581S

и любую их комбинацию.

В некоторых вариантах осуществления мутация JAK2 представляет собой мутацию в гене JAK2, включая, помимо прочего, мутацию T1923C в комбинации с мутацией G1920T, мутацию G1920T/C1922T или мутацию G1920A. В некоторых вариантах осуществления мутация JAK2 представляет собой мутантный белок JAK2, содержащий одну или более замен, включая, помимо прочего, V617F, V617I, R683G, N542_E543del, E543_D544del, R683S, R683X, F537_K539delinsL (делеция в рамке считывания), K539L, N1108S, R1113H, R1063H, R487C, I540Mfs*3 (делеция-сдвиг рамки считывания), R867Q, K539L, G571S, R1113C, R938Q, R228Q, L830*, E1080*, K539L, C618R, R564Q, D1036H, L1088S, H538Nfs*4, D873N, V392M, I682F, L393V, M535I, C618R, T875N, L611V, D319N, L611S, G921S, H538Y, S1035L и любую их комбинацию.

В некоторых вариантах осуществления мутация FBXW7 представляет собой точечную мутацию, выбранную из группы, состоящей из W244* (*: стоп-кодон), R222*, R278*, E192A, S282*, E113D, R465H/C, сплайсинга 726+1 G>A, R505C, R479Q, R465C, R367*, R499Vfs*25 (fs*: сдвиг рамки считывания), R658*, D600Y, D520N, D520Y и любой их комбинации. В дополнительных вариантах осуществления мутация FBXW7 представляет собой двойную или тройную мутацию, включая, помимо прочего, R479Q и S582L, R465H и S582L, D520N, D520Y и R14Q, а также R367* и S582L.

В некоторых вариантах осуществления мутация CCND3 включает, помимо прочего, S259A, R271Pfs*53 (сдвиг рамки, обусловленный вставкой),

E51*, Q260*, P199S, T283A, T283P, V287D, D286_T288del, R271Gfs*33, Q276*, R241Q, D238G, R33P, I290K, I290T, I290R, P267fs, P284S, P284L, P100S, E253D, S262I, R14W, R114L, D238N, A266E, R167W и любую их комбинацию.

В некоторых вариантах осуществления мутация GNA11 включает, помимо прочего,

Q209L, R183C, T257=, R183C, G208Afs*16, Q209H, R183C, Q209P, Q209R, Q209H, ?T96=, R210W, R256Q, T334=, G48D, S53G, Q209P, R213Q

и любую их комбинацию. В некоторых вариантах осуществления мутация GNA11 имеет две мутации в экзоне 4, например, мутацию в VI82 и мутацию в T175, или одну или более мутаций в экзоне 5.

2. Комбинации с ингибиторами PD-1 и PD-L1.

В некоторых вариантах осуществления терапия TIL, предоставляемая пациентам, страдающих от рака, может включать лечение только терапевтическими популяциями TIL или может включать комбинированное лечение, включающее TIL и один или более ингибиторов PD-1 и/или PD-L1.

Запрограммированная смерть 1 (PD-1) представляет собой трансмембранный рецепторный белок иммуноконтрольной точки из 288 аминокислот, экспрессируемый Т-клетками, В-клетками, натуральными киллерами (NK) Т-клетками, активированными моноцитами и дендритными клетками. PD-1, также известный как CD279, принадлежит к семейству CD28 и у человека кодируется геном Pdcd1 на хромосоме 2. PD-1 состоит из одного домена суперсемейства иммуноглобулинов (Ig), трансмембранной области и внутриклеточного домена, содержащего ингибиторный мотив иммунорецептора на основе тирозина (ITIM) и мотив переключения иммунорецептора на основе тирозина (ITSM). Известно, что PD-1 и его лиганды (PD-L1 и PD-L2) играют ключевую роль в иммунной толерантности, как описано в публикации Keir, et al., Annu. Rev. Immunol. 2008, 26, 677-704. PD-1 обеспечивает ингибирующие сигналы, которые негативно регулируют иммунные ответы Т-клеток. PD-L1 (также известный как B7-H1 или CD274) и PD-L2 (также известный как B7-DC или CD273) экспрессируются на опухолевых и стромальных клетках, с которыми могут столкнуться активированные Т-клетки, экспрессирующие PD-1, что приводит к иммуносупрессии Т-клеток. PD-L1 представляет собой трансмембранный белок из 290 аминокислот, кодируемый геном Cd274 на хромосоме 9 человека. Блокирование взаимодействия между PD-1 и его лигандами PD-L1 и PD-L2 с помощью ингибитора PD-1, ингибитора PD-L1 и/или ингибитора PD-L2 может преодолеть иммунную резистентность, как показано в недавних клинических исследованиях, таких как описанные в публикации Topalian, et al., N. Eng. J. Med. 2012, 366, 2443-54. PD-L1 экспрессируется на многих опухолевых клеточных линиях, в то время как PD-L2 экспрессируется в основном на дендритных клетках и нескольких опухолевых линиях. Помимо Т-клеток (которые индуцибельно экспрессируют PD-1 после активации), PD-1 также экспрессируется на В-клетках, натуральных клетках-киллерах, макрофагах, активированных моноцитах и дендритных клетках.

В одном варианте осуществления ингибитор PD-1 может представлять собой любой ингибитор PD-1 или блокатор PD-1, известный в данной области техники. В частности, это один из ингибиторов или блокаторов PD-1, более подробно описанных в следующих абзацах. Термины "ингибитор", "антагонист" и "блокатор" применяются в настоящем документе взаимозаменяемо в отношении ингибиторов PD-1. Во избежание сомнений ссылки в настоящем документе на ингибитор PD-1, который представляет собой антитело, могут относиться к соединению или его антигенсвязывающим фрагментам, вариантам, конъюгатам или биоаналогам. Во избежание сомнений ссылки в настоящем документе на ингибитор PD-1 могут также относиться к низкомолекулярному соединению или его фармацевтически приемлемой соли, сложному эфиру, сольвату, гидрату, сокристаллу или пролекарству.

В предпочтительном варианте осуществления ингибитор PD-1 представляет собой антитело (т.е. антитело к PD-1), его фрагмент, включая Fab-фрагменты, или его одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv). В некоторых вариантах осуществления ингибитор PD-1 представляет собой поликлональное антитело. В предпочтительном варианте осуществления ингибитор PD-1 представляет собой моноклональное антитело. В некоторых вариантах осуществления ингибитор PD-1 конкурирует за связывание с PD-1 и/или связывается с эпитопом на PD-1. В одном варианте осуществления антитело конкурирует за связывание с PD-1 и/или связывается с эпитопом на PD-1.

В некоторых вариантах осуществления ингибитор PD-1 представляет собой ингибитор, который связывает PD-1 человека с KD около 100 пМ или менее, связывает PD-1 человека с KD около 90 пМ или менее, связывает PD-1 человека с KD около 80 пМ или менее, связывает PD-1 человека с KD около 70 пМ или менее, связывает PD-1 человека с KD около 60 пМ или менее, связывает PD-1 человека с KD около 50 пМ или менее, связывает PD-1 человека с KD около 40 пМ или менее, связывает PD-1 человека с KD около 30 пМ или менее, связывает PD-1 человека с KD около 20 пМ или менее, связывает PD-1 человека с KD около 10 пМ или менее, или связывает PD-1 человека с KD около 1 пМ или менее.

В некоторых вариантах осуществления ингибитор PD-1 представляет собой ингибитор, который связывается с PD-1 человека с kassoc около $7,5\times10^5$ л/мс или быстрее, связывается с PD-1 человека с kassoc около 7,5×105 л/мс или быстрее, связывается с PD-1 человека с kassoc около 8×10^5 л/мс или быстрее, связывается с PD-1 человека с kassoc около $8,5\times10^5$ л/мс или быстрее, связывается с PD-1 человека с kassoc около 9×10^5 л/мс или быстрее, связывается с PD-1 человека с kassoc около $9,5\times10^5$ л/мс или быстрее или связывается с PD-1 человека с kassoc около 1×10^6 л/мс или быстрее.

В некоторых вариантах осуществления ингибитор PD-1 представляет собой ингибитор, который связывается с PD-1 человека с kdissoc около 2×10^{-5} л/с или медленнее, связывается с PD-1 человека с kdissoc около $2,1\times10^{-5}$ л/с или медленнее, связывается с PD-1 человека с kdissoc около $2,2\times10^{-5}$ л/с или медленнее, связывается с PD-1 человека с kdissoc около $2,3\times10^{-5}$ л/с или медленнее, связывается с PD-1 человека с kdissoc около $2,4\times10^{-5}$ л/с или медленнее, связывается с PD-1 человека с kdissoc около $2,5\times10^{-5}$ л/с или медленнее, связывается с PD-1 человека с kdissoc около $2,6\times10^{-5}$ л/с или медленнее или связывается с PD-1 человека с kdissoc около $2,7\times10^{-5}$ л/с или медленнее, связывается с PD-1 человека с kdissoc около $2,8\times10^{-5}$ л/с или медленнее, связывается с PD-1 человека с kdissoc около $2,9\times10^{-5}$ л/с или медленнее или связывается с PD-1 человека с kdissoc около 3×10^{-5} л/с или медленнее.

В некоторых вариантах осуществления ингибитор PD-1 представляет собой ингибитор, который блокирует или ингибирует связывание PD-L1 человека или PD-L2 человека с PD-1 человека с IC_{50} около 10 нМ или менее, блокирует или ингибирует связывание PD-L1 человека или PD-L2 человека с PD-1 человека с IC_{50} около 9 нМ или менее, блокирует или ингибирует связывание PD-L1 человека или PD-L2 человека с PD-1 человека с IC_{50} около 8 нМ или менее, блокирует или ингибирует связывание PD-L1 или PD-L2 человека с PD-1 человека с IC_{50} около 7 нМ или менее, блокирует или ингибирует связывание PD-L1 или PD-L2 человека с PD-1 человека с IC_{50} около 6 нМ или менее, блокирует или ингибирует связывание PD-L1 или PD-L2 человека с PD-1 человека с IC_{50} около 5 нМ или менее, блокирует или ингибирует связывание PD-L1 или PD-L2 человека с PD-1 человека с IC_{50} около 4 нМ или менее, блокирует или ингибирует связывание PD-L1 или PD-L2 человека с PD-1 человека с IC_{50} около 3 нМ или менее, блокирует или ингибирует связывание PD-L1 человека или PD-L2 человека с PD-1 человека с IC_{50} около 2 нМ или менее или блокирует или ингибирует связывание PD-L1 человека или PD-L2 человека с PD-1 человека с IC_{50} около 1 нМ или менее.

В одном варианте осуществления ингибитор PD-1 представляет собой ниволумаб (коммерчески доступный как OPDIVO от Bristol-Myers Squibb Co.) или его биоаналоги, антигенсвязывающие фрагменты, конъюгаты или варианты. Ниволумаб представляет собой полностью человеческое антитело IgG4, блокирующее рецептор PD-1. В одном варианте осуществления антитело к PD-1 представляет собой каппа-иммуноглобулин G4, антитело к CD274 человека. Ниволумабу присвоен регистрационный номер Chemical Abstracts Service (CAS) 946414-94-4, он также известен как 5C4, BMS-936558, MDX-1106 и ONO-4538. Получение и свойства ниволумаба описаны в патенте США № 8008449 и публикации международного патента № WO 2006/121168, описание которых включено в настоящий документ посредством ссылки. Клиническая безопасность и эффективность ниволумаба при различных формах рака описаны в публикациях Wang, et al., Cancer Immunol. Res. 2014, 2, 846-56; Page, et al., Ann. Rev. Med., 2014, 65, 185-202; и Weber, et al., J. Clin. Oncology, 2013, 31, 4311-4318,, описание которых включено в настоящий документ посредством ссылки. Аминокислотные последовательности ниволумаба представлены в табл. 18. Ниволумаб имеет дисульфидные связи внутри тяжелой цепи в положениях 22-96,140-196, 254-314, 360-418, 22"-96", 140"-196", 254"-314" и 360"-418"; дисульфидные связи внутри легкой цепи в положениях 23'-88', 134'-194', 23'"-88'" и 134'"-194'"; дисульфидные связи между тяжелой и легкой цепью в положениях 127-214', 127"-214'", дисульфидные связи между тяжелой цепью в положениях 219-219" и 222-222"; и сайты N-гликозилирования (H CH2 84,4) в положениях 290, 290".

В одном варианте осуществления ингибитор PD-1 содержит тяжелую цепь, представленную SEQ ID NO: 158, и легкую цепь, представленную SEQ ID NO: 159. В одном варианте осуществления ингибитор PD-1 содержит тяжелые и легкие цепи, имеющие последовательности, показанные в SEQ ID NO: 158 и SEQ ID NO: 159, соответственно, или антигенсвязывающие фрагменты, Fab-фрагменты, одноцепочечные вариабельные фрагменты (scFv), их варианты или конъюгаты. В одном варианте осуществления ингибитор PD-1 содержит тяжелую и легкую цепи, каждая из которых по меньшей мере на 99% идентична последовательностям, показанным в SEQ ID NO: 158 и SEQ ID NO: 159 соответственно. В одном варианте осуществления ингибитор PD-1 содержит тяжелую и легкую цепи, каждая из которых по меньшей мере на 98% идентична последовательностям, показанным в SEQ ID NO: 158 и SEQ ID NO: 159 соответственно. В одном варианте осуществления ингибитор PD-1 содержит тяжелую и легкую цепи, каждая из которых по меньшей мере на 97% идентична последовательностям, показанным в SEQ ID NO: 158 и SEQ ID NO: 159 соответственно. В одном варианте осуществления ингибитор PD-1 содержит тяжелую и легкую цепи, каждая из которых по меньшей мере на 96% идентична последовательностям, показанным в SEQ ID NO: 158 и SEQ ID NO: 159 соответственно. В одном варианте осуществления ингибитор PD-1 содержит тяжелую и легкую цепи, каждая из которых по меньшей мере на 95% идентична последовательностям, показанным в SEQ ID NO: 463 и SEQ ID NO: 159 соответственно.

В одном варианте осуществления ингибитор PD-1 содержит CDR тяжелой и легкой цепи или вариабельные области (VR) ниволумаба. В одном варианте осуществления вариабельная область тяжелой цепи (V_H) ингибитора PD-1 содержит последовательность, показанную в SEQ ID NO: 160, а вариабельная область легкой цепи (V_L) ингибитора PD-1 содержит последовательность, показанную в SEQ ID NO: 161, или их консервативные аминокислотные замены. В одном варианте осуществления ингибитор PD-1 содержит области V_H и V_L, каждая из которых по меньшей мере на 99% идентична последовательностям, показанным в SEQ ID NO: 160 и SEQ ID NO: 161 соответственно. В одном варианте осуществления ингибитор PD-1 содержит области V_H и V_L, каждая из которых по меньшей мере на 98% идентична последовательностям, показанным в SEQ ID NO: 160 и SEQ ID NO: 161 соответственно. В одном варианте осуществления ингибитор PD-1 содержит области V_H и V_L, каждая из которых по меньшей мере на 97% идентична последовательностям, показанным в SEQ ID NO: 160 и SEQ ID NO: 161 соответственно. В одном варианте осуществления ингибитор PD-1 содержит области V_H и V_L, каждая из которых по меньшей мере на 96% идентична последовательностям, показанным в SEQ ID NO: 160 и SEQ ID NO: 161 соответственно. В одном варианте осуществления ингибитор PD-1 содержит области V_H и V_L, каждая из которых по меньшей мере на 95% идентична последовательностям, показанным в SEQ ID NO: 160 и SEQ ID NO: 161 соответственно.

В одном варианте осуществления ингибитор PD-1 содержит домены CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, имеющие последовательности, указанные в SEQ ID NO: 162, SEQ ID NO: 163 и SEQ ID NO: 164 соответственно или их консервативные аминокислотные замены, и домены CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, имеющие последовательности, представленные в SEQ ID NO: 165, SEQ ID NO: 166 и SEQ ID NO: 167 соответственно, или их консервативные аминокислотные замены. В одном варианте осуществления антитело конкурирует за связывание и/или связывается с тем же эпитопом на PD-1, что и любое из вышеупомянутых антител.

В одном варианте осуществления ингибитор PD-1 представляет собой биоподобное моноклональное антитело к PD-1, одобренное регулирующими органами по лекарственным средствам в отношении ниволумаба. В одном варианте осуществления биоаналог содержит антитело к PD-1, содержащее аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 97% идентичность последовательности, например, 97%, 98%, 99% или 100% идентичность последовательности с аминокислотной последовательностью референтного лекарственного средства или референтного биологического продукта, который содержит одну или более посттрансляционных модификаций в сравнении с референтным лекарственным средством или референтным биологическим продуктом, причем референтное лекарственное средство или референтный биологический продукт представляет собой ниволумаб. В некоторых вариантах осуществления одна или более посттрансляционных модификаций выбраны из одного или более из следующего: гликозилирование, окисление, дезамидирование и укорочение. В некоторых вариантах осуществления биоаналог представляет собой антитело к PD-1, разрешенное или поданное на регистрацию, причем антитело к PD-1 предоставлено в составе, который отличается от составов референтного лекарственного средства или референтного биологического продукта, причем референтное лекарственное средство или референтный биологический продукт представляет собой ниволумаб. Антитело к PD-1 может быть разрешено регулирующим органом по лекарственным средствам, таким как FDA США и/или EMA Европейского Союза. В некоторых вариантах осуществления биоаналог представлен в виде композиции, которая дополнительно содержит одно или более вспомогательных веществ, причем одно или более вспомогательных веществ являются такими же или отличными от вспомогательных веществ, содержащихся в референтном лекарственном средстве или референтном биологическом продукте, причем референтное лекарственное средство или референтный биологический продукт представляет собой ниволумаб. В некоторых вариантах осуществления биоаналог представлен в виде композиции, которая дополнительно содержит одно или более вспомогательных веществ, причем одно или более вспомогательных веществ являются такими же или отличными от вспомогательных веществ, содержащихся в референтном лекарственном средстве или референтном биологическом продукте, причем референтное лекарственное средство или референтный биологический продукт представляет собой ниволумаб.

Таблица 18

Аминокислотные последовательности для ингибиторов PD-1, связанных с ниволумабом

Идентификатор	Последовательность (однобуквенные символы аминокислот)
SEQ ID NO:463 тяжелая цепь ниволумаба	QVQLVESGGG VVQPGRSLRL DCKASGITFS NSGMHWVRQA PGKGLEWVAV IWYDGSKRYY 60 ADSVKGRFTI SRDNSKNTLF LQMNSLRAED TAVYYCATND DYWGQGTLVT VSSASTKGPS 120 VFPLAPCSRS TSESTAALGC LVKDYFPEPV TVSWNSGALT SGVHTFPAVL QSSGLYSLSS 180

	VVTVPSSSLG TKTYTCNVDH KPSNTKVDKR VESKYGPPCP PCPAPEFLGG PSVFLFPPKP 240 KDTLMISRTP EVTCVVVDVS QEDPEVQFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQFN STYRVVSVLT 300 VLHQDWLNGK EYKCKVSNKG LPSSIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSQEE MTKNQVSLTC 360 LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTPPV LDSDGSFFLY SRLTVDKSRW QEGNVFSCSV 420 MHEALHNHYT QKSLSLSLGK 440
SEQ ID NO:159 легкая цепь ниволумаба	EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SYLAWYQQKP GQAPRLLIYD ASNRATGIPA 60 RFSGSGSGTD FTLTISSLEP EDFAVYYCQQ SSNWPRTFGQ GTKVEIKRTV AAPSVFIFPP 120 SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQWKV DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYSLSSTLT 180 LSKADYEKHK VYACEVTHQG LSSPVTKSFN RGEC 214
SEQ ID NO:160 вариабельная тяжелая цепь ниволумаба	QVQLVESGGG VVQPGRSLRL DCKASGITFS NSGMHWVRQA PGKGLEWVAV IWYDGSKRYY 60 ADSVKGRFTI SRDNSKNTLF LQMNSLRAED TAVYYCATND DYWGQGTLVT VSS 113
SEQ ID NO:161 вариабельная легкая цепь ниволумаба	EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SYLAWYQQKP GQAPRLLIYD ASNRATGIPA 60 RFSGSGSGTD FTLTISSLEP EDFAVYYCQQ SSNWPRTFGQ GTKVEIK 107
SEQ ID NO:162 CDR1 тяжелой цепи ниволумаба	NSGMH 5
SEQ ID NO:163 CDR2 тяжелой цепи ниволумаба	VIWYDGSKRY YADSVKG 17
SEQ ID NO:164 CDR3 тяжелой цепи ниволумаба	NDDY 4

SEQ ID NO:165 CDR1 легкой цепи ниволумаба	RASQSVSSYL A 11
SEQ ID NO:166 CDR2 легкой цепи ниволумаба	DASNRAT 7
SEQ ID NO:167 CDR3 легкой цепи ниволумаба	QQSSNWPRT 9

В некоторых вариантах осуществления ингибитор PD-1 представляет собой ниволумаб или его биоаналог, причем ниволумаб вводят в дозе от около 0,5 мг/кг до около 10 мг/кг. В некоторых вариантах осуществления ингибитор PD-1 представляет собой ниволумаб или его биоаналог, причем ниволумаб вводят в дозе около 0,5 мг/кг, около 1 мг/кг, около 1,5 мг/кг, около 2 мг/кг, около 2,5 мг/кг, около 3 мг/кг, около 3,5 мг/кг, около 4 мг/кг, около 4,5 мг/кг, около 5 мг/кг, около 5,5 мг/кг, около 6 мг/кг, около 6,5 мг/кг, около 7 мг/кг, около 7,5 мг/кг, около 8 мг/кг, около 8,5 мг/кг, около 9 мг/кг, около 9,5 мг/кг или около 10 мг/кг. В некоторых вариантах осуществления введение ниволумаба начинают через 1, 2, 3, 4 или 5 дней после введения IL-2. В некоторых вариантах осуществления введение ниволумаба начинают через 1, 2 или 3 дня после введения IL-2. В некоторых вариантах осуществления ниволумаб также можно вводить за 1, 2, 3, 4 или 5 недель до резекции (т.е. до получения образца опухоли у субъекта или пациента). В некоторых вариантах осуществления ниволумаб также можно вводить за 1, 2 или 3 недели до резекции (т.е. до получения образца опухоли у субъекта или пациента).

В некоторых вариантах осуществления ингибитор PD-1 представляет собой ниволумаб или его биоаналог, причем ниволумаб вводят в дозе от около 200 мг до около 500 мг. В некоторых вариантах осуществления ингибитор PD-1 представляет собой ниволумаб или его биоаналог, причем ниволумаб вводят в дозе около 200 мг, около 220 мг, около 240 мг, около 260 мг, около 280 мг, около 300 мг, около 320 мг, около 340 мг, около 360 мг, около 380 мг, около 400 мг, около 420 мг, около 440 мг, около 460 мг, около 480 мг или около 500 мг. В некоторых вариантах осуществления введение ниволумаба начинают через 1, 2, 3, 4 или 5 дней после введения IL-2. В некоторых вариантах осуществления введение ниволумаба начинают через 1, 2 или 3 дня после введения IL-2. В некоторых вариантах осуществления ниволумаб также можно вводить за 1, 2, 3, 4 или 5 недель до резекции (т.е. до получения образца опухоли у субъекта или пациента). В некоторых вариантах осуществления ниволумаб также можно вводить за 1, 2 или 3 недели до резекции (т.е. до получения образца опухоли у субъекта или пациента).

В некоторых вариантах осуществления ингибитор PD-1 представляет собой ниволумаб или его биоаналог, причем ниволумаб вводят каждые 2 недели, каждые 3 недели, каждые 4 недели, каждые 5 недель или каждые 6 недель. В некоторых вариантах осуществления введение ниволумаба начинают через 1, 2, 3, 4 или 5 дней после введения IL-2. В некоторых вариантах осуществления введение ниволумаба начинают через 1, 2 или 3 дня после введения IL-2. В некоторых вариантах осуществления ниволумаб также можно вводить за 1, 2, 3, 4 или 5 недель до резекции (т.е. до получения образца опухоли у субъекта или пациента). В некоторых вариантах осуществления ниволумаб также можно вводить за 1, 2 или 3 недели до резекции (т.е. до получения образца опухоли у субъекта или пациента).

В некоторых вариантах осуществления ниволумаб вводят для лечения нерезектабельной или метастатической меланомы. В некоторых вариантах осуществления ниволумаб вводят для лечения нерезектабельной или метастатической меланомы в дозе около 240 мг каждые 2 недели. В некоторых вариантах осуществления ниволумаб вводят для лечения нерезектабельной или метастатической меланомы в дозе около 480 мг каждые 4 недели. В некоторых вариантах осуществления ниволумаб вводят для лечения нерезектабельной или метастатической меланомы в дозе около 1 мг/кг с последующим введением ипилимумаба в дозе 3 мг/кг в тот же день каждые 3 недели в виде 4 доз, затем 240 мг каждые 2 недели или 480 мг каждые 4 недели. В некоторых вариантах осуществления введение ниволумаба начинают через 1, 2, 3, 4 или 5 дней после введения IL-2. В некоторых вариантах осуществления введение ниволумаба начинают через 1, 2 или 3 дня после введения IL-2. В некоторых вариантах осуществления ниволумаб также можно вводить за 1, 2, 3, 4 или 5 недель до резекции (т.е. до получения образца опухоли у субъекта или пациента). В некоторых вариантах осуществления ниволумаб также можно вводить за 1, 2 или 3 недели до резекции (т.е. до получения образца опухоли у субъекта или пациента).

В некоторых вариантах осуществления ниволумаб вводят для адъювантного лечения меланомы. В некоторых вариантах осуществления ниволумаб вводят для адъювантного лечения меланомы в дозе около 240 мг каждые 2 недели. В некоторых вариантах осуществления ниволумаб вводят для адъювантного лечения меланомы в дозе около 480 мг каждые 4 недели. В некоторых вариантах осуществления введе-

ние ниволумаба начинают через 1, 2, 3, 4 или 5 дней после введения IL-2. В некоторых вариантах осуществления введение ниволумаба начинают через 1, 2 или 3 дня после введения IL-2. В некоторых вариантах осуществления ниволумаб также можно вводить за 1, 2, 3, 4 или 5 недель до резекции (т.е. до получения образца опухоли у субъекта или пациента). В некоторых вариантах осуществления ниволумаб также можно вводить за 1, 2 или 3 недели до резекции (т.е. до получения образца опухоли у субъекта или пациента).

В некоторых вариантах осуществления ниволумаб вводят для лечения метастатического немелкоклеточного рака легкого. В некоторых вариантах осуществления ниволумаб вводят для лечения метастатического немелкоклеточного рака легкого в дозе около 3 мг/кг каждые 2 недели вместе с ипилимумабом в дозе около 1 мг/кг каждые 6 недель. В некоторых вариантах осуществления ниволумаб вводят для лечения метастатического немелкоклеточного рака легкого в дозе около 360 мг каждые 3 недели с ипилимумабом в дозе 1 мг/кг каждые 6 недель и 2 циклами химиотерапии на основе дублетов платины. В некоторых вариантах осуществления ниволумаб вводят для лечения метастатического немелкоклеточного рака легкого в дозе около 240 мг каждые 2 недели или 480 мг каждые 4 недели. В некоторых вариантах осуществления введение ниволумаба начинают через 1, 2, 3, 4 или 5 дней после введения IL-2. В некоторых вариантах осуществления введение ниволумаба начинают через 1, 2 или 3 дня после введения IL-2. В некоторых вариантах осуществления ниволумаб также можно вводить за 1, 2, 3, 4 или 5 недель до резекции (т.е. до получения образца опухоли у субъекта или пациента). В некоторых вариантах осуществления ниволумаб также можно вводить за 1, 2 или 3 недели до резекции (т.е. до получения образца опухоли у субъекта или пациента).

В некоторых вариантах осуществления ниволумаб вводят для лечения мелкоклеточного рака легкого. В некоторых вариантах осуществления ниволумаб вводят для лечения мелкоклеточного рака легкого в дозе около 240 мг каждые 2 недели. В некоторых вариантах осуществления введение ниволумаба начинают через 1, 2, 3, 4 или 5 дней после введения IL-2. В некоторых вариантах осуществления введение ниволумаба начинают через 1, 2 или 3 дня после введения IL-2. В некоторых вариантах осуществления ниволумаб также можно вводить за 1, 2, 3, 4 или 5 недель до резекции (т.е. до получения образца опухоли у субъекта или пациента). В некоторых вариантах осуществления ниволумаб также можно вводить за 1, 2 или 3 недели до резекции (т.е. до получения образца опухоли у субъекта или пациента).

В некоторых вариантах осуществления ниволумаб вводят для лечения злокачественной мезотелиомы плевры в дозе около 360 мг каждые 3 недели с ипилимумабом в дозе 1 мг/кг каждые 6 недель. В некоторых вариантах осуществления введение ниволумаба начинают через 1, 2, 3, 4 или 5 дней после введения IL-2. В некоторых вариантах осуществления введение ниволумаба начинают через 1, 2 или 3 дня после введения IL-2. В некоторых вариантах осуществления ниволумаб также можно вводить за 1, 2, 3, 4 или 5 недель до резекции (т.е. до получения образца опухоли у субъекта или пациента). В некоторых вариантах осуществления ниволумаб также можно вводить за 1, 2 или 3 недели до резекции (т.е. до получения образца опухоли у субъекта или пациента).

В некоторых вариантах осуществления ниволумаб вводят для лечения распространенного почечно-клеточного рака. В некоторых вариантах осуществления ниволумаб вводят для лечения распространенного почечно-клеточного рака в дозе около 240 мг каждые 2 недели. В некоторых вариантах осуществления ниволумаб вводят для лечения распространенного почечно-клеточного рака в дозе около 480 мг каждые 4 недели. В некоторых вариантах осуществления ниволумаб вводят для лечения распространенного почечно-клеточного рака в дозе около 3 мг/кг с последующим введением ипилимумаба в дозе около 1 мг/кг в тот же день каждые 3 недели в виде 4 доз, затем по 240 мг каждые 2 недели. В некоторых вариантах осуществления ниволумаб вводят для лечения распространенного почечно-клеточного рака в дозе около 3 мг/кг с последующим введением ипилимумаба в дозе около 1 мг/кг в тот же день каждые 3 недели в виде 4 доз, затем 240 мг каждые 2 недели, 480 мг каждые 4 недели. В некоторых вариантах осуществления введение ниволумаба начинают через 1, 2, 3, 4 или 5 дней после введения IL-2. В некоторых вариантах осуществления введение ниволумаба начинают через 1, 2 или 3 дня после введения IL-2. В некоторых вариантах осуществления ниволумаб также можно вводить за 1, 2, 3, 4 или 5 недель до резекции (т.е. до получения образца опухоли у субъекта или пациента). В некоторых вариантах осуществления ниволумаб также можно вводить за 1, 2 или 3 недели до резекции (т.е. до получения образца опухоли у субъекта или пациента).

В некоторых вариантах осуществления ниволумаб вводят для лечения классической лимфомы Ходжкина. В некоторых вариантах осуществления ниволумаб вводят для лечения классической лимфомы Ходжкина в дозе около 240 мг каждые 2 недели. В некоторых вариантах осуществления ниволумаб вводят для лечения классической лимфомы Ходжкина в дозе около 480 мг каждые 4 недели. В некоторых вариантах осуществления введение ниволумаба начинают через 1, 2, 3, 4 или 5 дней после введения IL-2. В некоторых вариантах осуществления введение ниволумаба начинают через 1, 2 или 3 дня после введения IL-2. В некоторых вариантах осуществления ниволумаб также можно вводить за 1, 2, 3, 4 или 5 недель до резекции (т.е. до получения образца опухоли у субъекта или пациента). В некоторых вариантах осуществления ниволумаб также можно вводить за 1, 2 или 3 недели до резекции (т.е. до получения образца опухоли у субъекта или пациента).

В некоторых вариантах осуществления ниволумаб вводят для лечения рецидивирующей или метастатической плоскоклеточной карциномы головы и шеи. В некоторых вариантах осуществления ниволумаб вводят для лечения рецидивирующей или метастатической плоскоклеточной карциномы головы и шеи в дозе около 240 мг каждые 2 недели. В некоторых вариантах осуществления ниволумаб вводят для лечения рецидивирующей или метастатической плоскоклеточной карциномы головы и шеи в дозе около 480 мг каждые 4 недели. В некоторых вариантах осуществления введение ниволумаба начинают через 1, 2, 3, 4 или 5 дней после введения IL-2. В некоторых вариантах осуществления введение ниволумаба начинают через 1, 2 или 3 дня после введения IL-2. В некоторых вариантах осуществления ниволумаб также можно вводить за 1, 2, 3, 4 или 5 недель до резекции (т.е. до получения образца опухоли у субъекта или пациента). В некоторых вариантах осуществления ниволумаб также можно вводить за 1, 2 или 3 недели до резекции (т.е. до получения образца опухоли у субъекта или пациента).

В некоторых вариантах осуществления ниволумаб вводят для лечения местно-распространенной или метастатической уротелиальной карциномы в дозе около 240 мг каждые 2 недели. В некоторых вариантах осуществления ниволумаб вводят для лечения местно-распространенной или метастатической уротелиальной карциномы в дозе около 480 мг каждые 4 недели. В некоторых вариантах осуществления введение ниволумаба начинают через 1, 2, 3, 4 или 5 дней после введения IL-2. В некоторых вариантах осуществления введение ниволумаба начинают через 1, 2 или 3 дня после введения IL-2. В некоторых вариантах осуществления ниволумаб также можно вводить за 1, 2, 3, 4 или 5 недель до резекции (т.е. до получения образца опухоли у субъекта или пациента). В некоторых вариантах осуществления ниволумаб также можно вводить за 1, 2 или 3 недели до резекции (т.е. до получения образца опухоли у субъекта или пациента).

В некоторых вариантах осуществления ниволумаб вводят для лечения метастатического колоректального рака с высокой микросателлитной нестабильностью (MSI-H) или дефицитом репарации несоответствия (dMMR). В некоторых вариантах осуществления ниволумаб вводят для лечения метастатического колоректального рака с высокой микросателлитной нестабильностью (MSI-H) или дефицитом репарации несоответствия (dMMR) у взрослых и педиатрических пациентов. В некоторых вариантах осуществления ниволумаб вводят для лечения метастатического колоректального рака с высокой микросателлитной нестабильностью (MSI-H) или дефицитом репарации несоответствия (dMMR) у взрослых и педиатрических пациентов с массой тела не менее 40 кг в дозе около 240 мг каждые 2 недели. В некоторых вариантах осуществления ниволумаб вводят для лечения метастатического колоректального рака с высокой микросателлитной нестабильностью (MSI-H) или дефицитом репарации несоответствия (dMMR) у взрослых и педиатрических пациентов с массой тела не менее 40 кг в дозе около 480 мг каждые 4 недели. В некоторых вариантах осуществления введение ниволумаба начинают через 1, 2, 3, 4 или 5 дней после введения IL-2. В некоторых вариантах осуществления введение ниволумаба начинают через 1, 2 или 3 дня после введения IL-2. В некоторых вариантах осуществления ниволумаб также можно вводить за 1, 2, 3, 4 или 5 недель до резекции (т.е. до получения образца опухоли у субъекта или пациента). В некоторых вариантах осуществления ниволумаб также можно вводить за 1, 2 или 3 недели до резекции (т.е. до получения образца опухоли у субъекта или пациента).

В некоторых вариантах осуществления ниволумаб вводят для лечения метастатического колоректального рака с высокой микросателлитной нестабильностью (MSI-H) или дефицитом репарации несоответствия (dMMR) у педиатрических пациентов с массой тела менее 40 кг в дозе около 3 мг/кг каждые 2 недели. В некоторых вариантах осуществления ниволумаб вводят для лечения метастатического колоректального рака с высокой микросателлитной нестабильностью (MSI-H) или дефицитом репарации несоответствия (dMMR) у взрослых и педиатрических пациентов с массой тела не менее 40 кг в дозе около 3 мг/кг с последующим введением ипилимумаба в дозе 1 мг/кг в тот же день каждые 3 недели по 4 дозы, затем по 240 мг каждые 2 недели. В некоторых вариантах осуществления ниволумаб вводят для лечения метастатического колоректального рака с высокой микросателлитной нестабильностью (MSI-H) или дефицитом репарации несоответствия (dMMR) у взрослых и педиатрических пациентов с массой тела не менее 40 кг в дозе около 3 мг/кг с последующим введением ипилимумаба в дозе 1 мг/кг в тот же день каждые 3 недели по 4 дозы, затем по 480 мг каждые 4 недели. В некоторых вариантах осуществления введение ниволумаба начинают через 1, 2, 3, 4 или 5 дней после введения IL-2. В некоторых вариантах осуществления введение ниволумаба начинают через 1, 2 или 3 дня после введения IL-2. В некоторых вариантах осуществления ниволумаб также можно вводить за 1, 2, 3, 4 или 5 недель до резекции (т.е. до получения образца опухоли у субъекта или пациента). В некоторых вариантах осуществления ниволумаб также можно вводить за 1, 2 или 3 недели до резекции (т.е. до получения образца опухоли у субъекта или пациента).

В некоторых вариантах осуществления ниволумаб вводят для лечения гепатоцеллюлярной карциномы. В некоторых вариантах осуществления ниволумаб вводят для лечения гепатоцеллюлярной карциномы в дозе около 240 мг каждые 2 недели. В некоторых вариантах осуществления ниволумаб вводят для лечения гепатоцеллюлярной карциномы в дозе около 480 мг каждые 4 недели. В некоторых вариантах осуществления ниволумаб вводят для лечения гепатоцеллюлярной карциномы в дозе около 1 мг/кг с последующим введением ипилимумаба в дозе 3 мг/кг в тот же день каждые 3 недели в виде 4 доз, затем

по 240 мг каждые 2 недели. В некоторых вариантах осуществления ниволумаб вводят для лечения гепатоцеллюлярной карциномы в дозе около 1 мг/кг с последующим введением ипилимумаба в дозе 3 мг/кг в тот же день каждые 3 недели в виде 4 доз, затем по 480 мг каждые 4 недели. В некоторых вариантах осуществления введение ниволумаба начинают через 1, 2, 3, 4 или 5 дней после введения IL-2. В некоторых вариантах осуществления введение ниволумаба начинают через 1, 2 или 3 дня после введения IL-2. В некоторых вариантах осуществления ниволумаб также можно вводить за 1, 2, 3, 4 или 5 недель до резекции (т.е. до получения образца опухоли у субъекта или пациента). В некоторых вариантах осуществления ниволумаб также можно вводить за 1, 2 или 3 недели до резекции (т.е. до получения образца опухоли у субъекта или пациента).

В некоторых вариантах осуществления ниволумаб вводят для лечения плоскоклеточного рака пищевода. В некоторых вариантах осуществления ниволумаб вводят для лечения плоскоклеточного рака пищевода в дозе около 240 мг каждые 2 недели. В некоторых вариантах осуществления ниволумаб вводят для лечения плоскоклеточного рака пищевода в дозе около 480 мг каждые 4 недели. В некоторых вариантах осуществления введение ниволумаба начинают через 1, 2, 3, 4 или 5 дней после введения IL-2. В некоторых вариантах осуществления введение ниволумаба начинают через 1, 2 или 3 дня после введения IL-2. В некоторых вариантах осуществления ниволумаб также можно вводить за 1, 2, 3, 4 или 5 недель до резекции (т.е. до получения образца опухоли у субъекта или пациента). В некоторых вариантах осуществления ниволумаб также можно вводить за 1, 2 или 3 недели до резекции (т.е. до получения образца опухоли у субъекта или пациента).

В другом варианте осуществления ингибитор PD-1 включает пембролизумаб (коммерчески доступный как KEYTRUDA от Merck & Co., Inc., Кенилворт, штат Нью-Джерси, США) или его антигенсвязывающие фрагменты, конъюгаты или варианты. Пембролизумабу присвоен регистрационный номер CAS 1374853-91-4, он также известен как ламбролизумаб, MK-3475 и SCH-900475. Пембролизумаб имеет иммуноглобулин G4, анти-(белок PDCD1 человека (запрограммированная гибель клеток 1)) (моноклональная тяжелая цепь Mus musculus человека), дисульфид с моноклональной легкой цепью Mus musculus человека, димерную структуру. Структура пембролизумаба также может быть описана как иммуноглобулин G4, анти-(человеческая запрограммированная гибель клеток 1); гуманизированный мышиный моноклональный [228-L-пролин(H10-S>P)]γ4 тяжелой цепи (134-218')-дисульфид с гуманизированным мышиным моноклональным димером к легкой цепи (226-226":229-229")-бисдисульфид. Свойства, применение и получение пембролизумаба описаны в публикации международного патента № WO 2008/156712 A1, патенте США № 8354509 и публикациях патентных заявок США № US 2010/0266617 A1, US 2013/0108651 A1 и US 2013/0109843 A2, описание которых включено в настоящий документ посредством ссылки. Клиническая безопасность и эффективность пембролизумаба при различных формах рака описаны в публикациях Fuerst, Oncology Times, 2014, 36, 35-36; Robert, et al., Lancet, 2014, 384, 1109-17; и Thomas, et al., Exp. Opin. Biol. Ther., 2014, 14, 1061-1064. Аминокислотные последовательности пембролизумаба представлены в табл. 19. Пембролизумаб включает следующие дисульфидные мостики: 22-96, 22"-96", 23'-92', 23'"-92'", 134-218', 134"-218'", 138'-198', 138'"-198'", 147-203, 147"-203", 226-226", 229-229", 261-321, 26Г-32Г, 367-425 и 367"-425", а также следующие сайты гликозилирования (N): Asn-297 и Asn-297". Пембролизумаб представляет собой изотип IgG4/каппа со стабилизирующей мутацией S228P в области Fc; вставка этой мутации в шарнирную область IgG4 предотвращает образование половинных молекул, обычно наблюдаемых для антител IgG4. Пембролизумаб гетерогенно гликозилирован по Asn297 в Fc-домене каждой тяжелой цепи, что дает молекулярную массу интактного антитела приблизительно 149 кДа. Доминирующей гликоформой пембролизумаба является фукозилированная форма агалакто-диантеннарного гликана (G0F).

В одном варианте осуществления ингибитор PD-1 содержит тяжелую цепь, представленную SEQ ID NO: 168, и легкую цепь, представленную SEQ ID NO: 169. В одном варианте осуществления ингибитор PD-1 содержит тяжелые и легкие цепи, имеющие последовательности, показанные в SEQ ID NO: 168 и SEQ ID NO: 169, соответственно, или антигенсвязывающие фрагменты, Fab-фрагменты, одноцепочечные вариабельные фрагменты (scFv), их варианты или конъюгаты. В одном варианте осуществления ингибитор PD-1 содержит тяжелую и легкую цепи, каждая из которых по меньшей мере на 99% идентична последовательностям, показанным в SEQ ID NO: 168 и SEQ ID NO: 169 соответственно. В одном варианте осуществления ингибитор PD-1 содержит тяжелую и легкую цепи, каждая из которых по меньшей мере на 98% идентична последовательностям, показанным в SEQ ID NO: 168 и SEQ ID NO: 169 соответственно. В одном варианте осуществления ингибитор PD-1 содержит тяжелую и легкую цепи, каждая из которых по меньшей мере на 97% идентична последовательностям, показанным в SEQ ID NO: 168 и SEQ ID NO: 169 соответственно. В одном варианте осуществления ингибитор PD-1 содержит тяжелую и легкую цепи, каждая из которых по меньшей мере на 96% идентична последовательностям, показанным в SEQ ID NO: 168 и SEQ ID NO: 169 соответственно. В одном варианте осуществления ингибитор PD-1 содержит тяжелую и легкую цепи, каждая из которых по меньшей мере на 95% идентична последовательностям, показанным в SEQ ID NO: 168 и SEQ ID NO: 169 соответственно.

В одном варианте осуществления ингибитор PD-1 содержит CDR тяжелой и легкой цепи или вариабельные области (VR) пембролизумаба. В одном варианте осуществления вариабельная область тя-

желой цепи (V_H) ингибитора PD-1 содержит последовательность, показанную в SEQ ID NO: 170, а вариабельная область легкой цепи (V_L) ингибитора PD-1 содержит последовательность, показанную в SEQ ID NO: 171, или их консервативные аминокислотные замены. В одном варианте осуществления ингибитор PD-1 содержит области V_H и V_L, каждая из которых по меньшей мере на 99% идентична последовательностям, показанным в SEQ ID NO: 170 и SEQ ID NO: 171 соответственно. В одном варианте осуществления ингибитор PD-1 содержит области V_H и V_L, каждая из которых по меньшей мере на 98% идентична последовательностям, показанным в SEQ ID NO: 170 и SEQ ID NO: 171 соответственно. В одном варианте осуществления ингибитор PD-1 содержит области V_H и V_L, каждая из которых по меньшей мере на 97% идентична последовательностям, показанным в SEQ ID NO: 170 и SEQ ID NO: 171 соответственно. В одном варианте осуществления ингибитор PD-1 содержит области V_H и V_L, каждая из которых по меньшей мере на 96% идентична последовательностям, показанным в SEQ ID NO: 170 и SEQ ID NO: 171 соответственно. В одном варианте осуществления ингибитор PD-1 содержит области V_H и V_L, каждая из которых по меньшей мере на 95% идентична последовательностям, показанным в SEQ ID NO: 170 и SEQ ID NO: 171 соответственно.

В одном варианте осуществления ингибитор PD-1 содержит домены CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, имеющие последовательности, указанные в SEQ ID NO: 172, SEQ ID NO: 173 и SEQ ID NO: 174 соответственно или их консервативные аминокислотные замены, и домены CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, имеющие последовательности, представленные в SEQ ID NO: 175, SEQ ID NO: 176 и SEQ ID NO: 177 соответственно, или их консервативные аминокислотные замены. В одном варианте осуществления антитело конкурирует за связывание и/или связывается с тем же эпитопом на PD-1, что и любое из вышеупомянутых антител.

В одном варианте осуществления ингибитор PD-1 представляет собой биоподобное моноклональное антитело к PD-1, одобренное регулирующими органами по лекарственным средствам в отношении пембролизумаба. В одном варианте осуществления биоаналог содержит антитело к PD-1, содержащее аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 97% идентичность последовательности, например, 97%, 98%, 99% или 100% идентичность последовательности с аминокислотной последовательностью референтного лекарственного средства или референтного биологического продукта, который содержит одну или более посттрансляционных модификаций в сравнении с референтным лекарственным средством или референтным биологическим продуктом, причем референтное лекарственное средство или референтный биологический продукт представляет собой пембролизумаб. В некоторых вариантах осуществления одна или более посттрансляционных модификаций выбраны из одного или более из следующего: гликозилирование, окисление, дезамидирование и укорочение. В некоторых вариантах осуществления биоаналог представляет собой антитело к PD-1, разрешенное или поданное на регистрацию, причем антитело к PD-1 предоставлено в составе, который отличается от составов референтного лекарственного средства или референтного биологического продукта, причем референтное лекарственное средство или референтный биологический продукт представляет собой пембролизумаб. Антитело к PD-1 может быть разрешено регулирующим органом по лекарственным средствам, таким как FDA США и/или EMA Европейского Союза. В некоторых вариантах осуществления биоаналог представлен в виде композиции, которая дополнительно содержит одно или более вспомогательных веществ, причем одно или более вспомогательных веществ являются такими же или отличными от вспомогательных веществ, содержащихся в референтном лекарственном средстве или референтном биологическом продукте, причем референтное лекарственное средство или референтный биологический продукт представляет собой пембролизумаб. В некоторых вариантах осуществления биоаналог представлен в виде композиции, которая дополнительно содержит одно или более вспомогательных веществ, причем одно или более вспомогательных веществ являются такими же или отличными от вспомогательных веществ, содержащихся в референтном лекарственном средстве или референтном биологическом продукте, причем референтное лекарственное средство или референтный биологический продукт представляет собой пембролизумаб.

Таблица 19

Аминокислотные последовательности для ингибиторов PD-1, связанных с пембролизумабом

Идентификатор	Последовательность (однобуквенные символы аминокислот)
SEQ ID NO:168 тяжелая цепь пембролизумаба	QVQLVQSGVE VKKPGASVKV SCKASGYTFT NYYMYWVRQA PGQGLEWMGG INPSNGGTNF 60 NEKFKNRVTL TTDSSTTTAY MELKSLQFDD TAVYYCARRD YRFDMGFDYW GQGTTVTVSS 120 ASTKGPSVFP LAPCSRSTSE STAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV HTFPAVLQSS 180 GLYSLSSVVT VPSSSLGTKT YTCNVDHKPS NTKVDKRVES KYGPPCPPCP APEFLGGPSV 240 FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSQED PEVQFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQFNSTY 300 RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKGLPS SIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSQEEMTK 360 NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTPPVLDS DGSFFLYSRL TVDKSRWQEG 420 NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSLGK 447
SEQ ID NO:169 легкая цепь	EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASKGVS TSGYSYLHWY QQKPGQAPRL LIYLASYLES 60

пембролизумаба	GVPARFSGSG SGTDFTLTIS SLEPEDFAVY YCQHSRDLPL TFGGGTKVEI KRTVAAPSVF 120 IFPPSDEQLK SGTASVVCLL NNFYPREAKV QWKVDNALQS GNSQESVTEQ DSKDSTYSLS 180 STLTLSKADY EKHKVYACEV THQGLSSPVT KSFNRGEC 218
SEQ ID NO:170 вариабельная тяжелая цепь пембролизумаба	QVQLVQSGVE VKKPGASVKV SCKASGYTFT NYYMYWVRQA PGQGLEWMGG INPSNGGTNF 60 NEKFKNRVTL TTDSSTTTAY MELKSLQFDD TAVYYCARRD YRFDMGFDYW GQGTTVTVSS 120
SEQ ID NO:171 вариабельная легкая цепь пембролизумаба	EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASKGVS TSGYSYLHWY QQKPGQAPRL LIYLASYLES 60 GVPARFSGSG SGTDFTLTIS SLEPEDFAVY YCQHSRDLPL TFGGGTKVEI K 111
SEQ ID NO:172 CDR1 тяжелой цепи пембролизумаба	NYYMY 5
SEQ ID NO:173 CDR2 тяжелой цепи пембролизумаба	GINPSNGGTN FNEKFK 16
SEQ ID NO:174 CDR3 тяжелой цепи пембролизумаба	RDYRFDMGFD Y 11
SEQ ID NO:175 CDR1 легкой цепи пембролизумаба	RASKGVSTSG YSYLH 15
SEQ ID NO:176 CDR2 легкой цепи пембролизумаба	LASYLES 7
SEQ ID NO:177 CDR3 легкой цепи пембролизумаба	QHSRDLPLT 9

В некоторых вариантах осуществления ингибитор PD-1 представляет собой пембролизумаб или его биоаналог, причем пембролизумаб вводят в дозе от около 0,5 мг/кг до около 10 мг/кг. В некоторых вариантах осуществления ингибитор PD-1 представляет собой пембролизумаб или его биоаналог, причем пембролизумаб вводят в дозе около 0,5 мг/кг, около 1 мг/кг, около 1,5 мг/кг, около 2 мг/кг, около 2,5 мг/кг, около 3 мг/кг, около 3,5 мг/кг, около 4 мг/кг, около 4,5 мг/кг, около 5 мг/кг, около 5,5 мг/кг, около 6 мг/кг, около 6,5 мг/кг, около 7 мг/кг, около 7,5 мг/кг, около 8 мг/кг, около 8,5 мг/кг, около 9 мг/кг, около 9,5 мг/кг или около 10 мг/кг. В некоторых вариантах осуществления введение пембролизумаба начинают через 1, 2, 3, 4 или 5 дней после введения IL-2. В некоторых вариантах осуществления введение пембролизумаба начинают через 1, 2 или 3 дня после введения IL-2. В некоторых вариантах осуществления пембролизумаб также можно вводить за 1, 2, 3, 4 или 5 недель до резекции (т.е. до получения образца опухоли у субъекта или пациента). В некоторых вариантах осуществления пембролизумаб также можно вводить за 1, 2 или 3 недели до резекции (т.е. до получения образца опухоли у субъекта или пациента).

В некоторых вариантах осуществления ингибитор PD-1 представляет собой пембролизумаб или его биоаналог, причем пембролизумаб вводят в дозе от около 200 мг до около 500 мг. В некоторых вариан-

тах осуществления ингибитор PD-1 представляет собой пембролизумаб или его биоаналог, причем ниволумаб вводят в дозе около 200 мг, около 220 мг, около 240 мг, около 260 мг, около 280 мг, около 300 мг, около 320 мг, около 340 мг, около 360 мг, около 380 мг, около 400 мг, около 420 мг, около 440 мг, около 460 мг, около 480 мг или около 500 мг. В некоторых вариантах осуществления введение пембролизумаба начинают через 1, 2, 3, 4 или 5 дней после введения IL-2. В некоторых вариантах осуществления введение пембролизумаба начинают через 1, 2 или 3 дня после введения IL-2. В некоторых вариантах осуществления пембролизумаб также можно вводить за 1, 2, 3, 4 или 5 недель до резекции (т.е. до получения образца опухоли у субъекта или пациента). В некоторых вариантах осуществления пембролизумаб также можно вводить за 1, 2 или 3 недели до резекции (т.е. до получения образца опухоли у субъекта или пациента).

В некоторых вариантах осуществления ингибитор PD-1 представляет собой пембролизумаб или его биоаналог, причем пембролизумаб вводят каждые 2 недели, каждые 3 недели, каждые 4 недели, каждые 5 недель или каждые 6 недель. В некоторых вариантах осуществления введение пембролизумаба начинают через 1, 2, 3, 4 или 5 дней после введения IL-2. В некоторых вариантах осуществления введение пембролизумаба начинают через 1, 2 или 3 дня после введения IL-2. В некоторых вариантах осуществления пембролизумаб также можно вводить за 1, 2, 3, 4 или 5 недель до резекции (т.е. до получения образца опухоли у субъекта или пациента). В некоторых вариантах осуществления пембролизумаб также можно вводить за 1, 2 или 3 недели до резекции (т.е. до получения образца опухоли у субъекта или пациента).

В некоторых вариантах осуществления пембролизумаб вводят для лечения меланомы. В некоторых вариантах осуществления пембролизумаб вводят для лечения меланомы в дозе около 200 мг каждые 3 недели. В некоторых вариантах осуществления пембролизумаб вводят для лечения меланомы в дозе около 400 мг каждые 6 недель. В некоторых вариантах осуществления введение пембролизумаба начинают через 1, 2, 3, 4 или 5 дней после введения IL-2. В некоторых вариантах осуществления введение пембролизумаба начинают через 1, 2 или 3 дня после введения IL-2. В некоторых вариантах осуществления пембролизумаб также можно вводить за 1, 2, 3, 4 или 5 недель до резекции (т.е. до получения образца опухоли у субъекта или пациента). В некоторых вариантах осуществления пембролизумаб также можно вводить за 1, 2 или 3 недели до резекции (т.е. до получения образца опухоли у субъекта или пациента).

В некоторых вариантах осуществления пембролизумаб вводят для лечения NSCLC. В некоторых вариантах осуществления пембролизумаб вводят для лечения NSCLC в дозе около 200 мг каждые 3 недели. В некоторых вариантах осуществления пембролизумаб вводят для лечения NSCLC в дозе около 400 мг каждые 6 недель. В некоторых вариантах осуществления введение пембролизумаба начинают через 1, 2, 3, 4 или 5 дней после введения IL-2. В некоторых вариантах осуществления введение пембролизумаба начинают через 1, 2 или 3 дня после введения IL-2. В некоторых вариантах осуществления пембролизумаб также можно вводить за 1, 2, 3, 4 или 5 недель до резекции (т.е. до получения образца опухоли у субъекта или пациента). В некоторых вариантах осуществления пембролизумаб также можно вводить за 1, 2 или 3 недели до резекции (т.е. до получения образца опухоли у субъекта или пациента).

В некоторых вариантах осуществления пембролизумаб вводят для лечения мелкоклеточного рака легкого (SCLC). В некоторых вариантах осуществления пембролизумаб вводят для лечения SCLC в дозе около 200 мг каждые 3 недели. В некоторых вариантах осуществления пембролизумаб вводят для лечения SCLC в дозе около 400 мг каждые 6 недель. В некоторых вариантах осуществления введение пембролизумаба начинают через 1, 2, 3, 4 или 5 дней после введения IL-2. В некоторых вариантах осуществления введение пембролизумаба начинают через 1, 2 или 3 дня после введения IL-2. В некоторых вариантах осуществления пембролизумаб также можно вводить за 1, 2, 3, 4 или 5 недель до резекции (т.е. до получения образца опухоли у субъекта или пациента). В некоторых вариантах осуществления пембролизумаб также можно вводить за 1, 2 или 3 недели до резекции (т.е. до получения образца опухоли у субъекта или пациента).

В некоторых вариантах осуществления пембролизумаб вводят для лечения плоскоклеточного рака головы и шеи (HNSCC). В некоторых вариантах осуществления пембролизумаб вводят для лечения HNSCC в дозе около 200 мг каждые 3 недели. В некоторых вариантах осуществления пембролизумаб вводят для лечения HNSCC в дозе около 400 мг каждые 6 недель. В некоторых вариантах осуществления введение пембролизумаба начинают через 1, 2, 3, 4 или 5 дней после введения IL-2. В некоторых вариантах осуществления введение пембролизумаба начинают через 1, 2 или 3 дня после введения IL-2. В некоторых вариантах осуществления пембролизумаб также можно вводить за 1, 2, 3, 4 или 5 недель до резекции (т.е. до получения образца опухоли у субъекта или пациента). В некоторых вариантах осуществления пембролизумаб также можно вводить за 1, 2 или 3 недели до резекции (т.е. до получения образца опухоли у субъекта или пациента).

В некоторых вариантах осуществления пембролизумаб вводят для лечения классической лимфомы Ходжкина (cHL) или первичной медиастинальной В-крупноклеточной лимфомы (PMBCL) в дозе около 200 мг каждые 3 недели. В некоторых вариантах осуществления пембролизумаб вводят для лечения классической лимфомы Ходжкина (cHL) или первичной медиастинальной В-крупноклеточной лимфомы (PMBCL) в дозе около 400 мг каждые 6 недель для взрослых. В некоторых вариантах осуществления

пембролизумаб вводят для лечения классической лимфомы Ходжкина (cHL) или первичной медиастинальной В-крупноклеточной лимфомы (PMBCL) в дозе около 2 мг/кг (вплоть до 200 мг) каждые 3 недели в педиатрии. В некоторых вариантах осуществления введение пембролизумаба начинают через 1, 2, 3, 4 или 5 дней после введения IL-2. В некоторых вариантах осуществления введение пембролизумаба начинают через 1, 2 или 3 дня после введения IL-2. В некоторых вариантах осуществления пембролизумаб также можно вводить за 1, 2, 3, 4 или 5 недель до резекции (т.е. до получения образца опухоли у субъекта или пациента). В некоторых вариантах осуществления пембролизумаб также можно вводить за 1, 2 или 3 недели до резекции (т.е. до получения образца опухоли у субъекта или пациента).

В некоторых вариантах осуществления пембролизумаб вводят для лечения уротелиальной карциномы в дозе около 200 мг каждые 3 недели. В некоторых вариантах осуществления пембролизумаб вводят для лечения уротелиальной карциномы в дозе около 400 мг каждые 6 недель. В некоторых вариантах осуществления введение пембролизумаба начинают через 1, 2, 3, 4 или 5 дней после введения IL-2. В некоторых вариантах осуществления введение пембролизумаба начинают через 1, 2 или 3 дня после введения IL-2. В некоторых вариантах осуществления пембролизумаб также можно вводить за 1, 2, 3, 4 или 5 недель до резекции (т.е. до получения образца опухоли у субъекта или пациента). В некоторых вариантах осуществления пембролизумаб также можно вводить за 1, 2 или 3 недели до резекции (т.е. до получения образца опухоли у субъекта или пациента).

В некоторых вариантах осуществления пембролизумаб вводят для лечения рака с высокой микросателлитной нестабильностью (MSI-H) или дефицитом репарации несоответствия (dMMR) в дозе около 200 мг каждые 3 недели. В некоторых вариантах осуществления пембролизумаб вводят для лечения рака с MSI-H или dMMR в дозе около 400 мг каждые 6 недель для взрослых. В некоторых вариантах осуществления пембролизумаб вводят для лечения рака с MSI-H или dMMR в дозе около 2 мг/кг (вплоть до 200 мг) каждые 3 недели в педиатрии. В некоторых вариантах осуществления введение пембролизумаба начинают через 1, 2, 3, 4 или 5 дней после введения IL-2. В некоторых вариантах осуществления введение пембролизумаба начинают через 1, 2 или 3 дня после введения IL-2. В некоторых вариантах осуществления пембролизумаб также можно вводить за 1, 2, 3, 4 или 5 недель до резекции (т.е. до получения образца опухоли у субъекта или пациента). В некоторых вариантах осуществления пембролизумаб также можно вводить за 1, 2 или 3 недели до резекции (т.е. до получения образца опухоли у субъекта или пациента). В некоторых вариантах осуществления введение пембролизумаба начинают через 1, 2, 3, 4 или 5 дней после введения IL-2. В некоторых вариантах осуществления введение пембролизумаба начинают через 1, 2 или 3 дня после введения IL-2. В некоторых вариантах осуществления пембролизумаб также можно вводить за 1, 2, 3, 4 или 5 недель до резекции (т.е. до получения образца опухоли у субъекта или пациента). В некоторых вариантах осуществления пембролизумаб также можно вводить за 1, 2 или 3 недели до резекции (т.е. до получения образца опухоли у субъекта или пациента).

В некоторых вариантах осуществления пембролизумаб вводят для лечения колоректального рака (CRC) с высокой микросателлитной нестабильностью (MSI-H) или дефицитом репарации несоответствия (dMMR) в дозе около 200 мг каждые 3 недели. В некоторых вариантах осуществления пембролизумаб вводят для лечения CRC с MSI-H или dMMR в дозе около 400 мг каждые 6 недель. В некоторых вариантах осуществления введение пембролизумаба начинают через 1, 2, 3, 4 или 5 дней после введения IL-2. В некоторых вариантах осуществления введение пембролизумаба начинают через 1, 2 или 3 дня после введения IL-2. В некоторых вариантах осуществления пембролизумаб также можно вводить за 1, 2, 3, 4 или 5 недель до резекции (т.е. до получения образца опухоли у субъекта или пациента). В некоторых вариантах осуществления пембролизумаб также можно вводить за 1, 2 или 3 недели до резекции (т.е. до получения образца опухоли у субъекта или пациента).

В некоторых вариантах осуществления пембролизумаб вводят для лечения рака желудка в дозе около 200 мг каждые 3 недели. В некоторых вариантах осуществления пембролизумаб вводят для лечения рака желудка в дозе около 400 мг каждые 6 недель. В некоторых вариантах осуществления введение пембролизумаба начинают через 1, 2, 3, 4 или 5 дней после введения IL-2. В некоторых вариантах осуществления введение пембролизумаба начинают через 1, 2 или 3 дня после введения IL-2. В некоторых вариантах осуществления пембролизумаб также можно вводить за 1, 2, 3, 4 или 5 недель до резекции (т.е. до получения образца опухоли у субъекта или пациента). В некоторых вариантах осуществления пембролизумаб также можно вводить за 1, 2 или 3 недели до резекции (т.е. до получения образца опухоли у субъекта или пациента).

В некоторых вариантах осуществления пембролизумаб вводят для лечения рака пищевода в дозе около 200 мг каждые 3 недели. В некоторых вариантах осуществления пембролизумаб вводят для лечения рака пищевода в дозе около 400 мг каждые 6 недели. В некоторых вариантах осуществления введение пембролизумаба начинают через 1, 2, 3, 4 или 5 дней после введения IL-2. В некоторых вариантах осуществления введение пембролизумаба начинают через 1, 2 или 3 дня после введения IL-2. В некоторых вариантах осуществления пембролизумаб также можно вводить за 1, 2, 3, 4 или 5 недель до резекции (т.е. до получения образца опухоли у субъекта или пациента). В некоторых вариантах осуществления пембролизумаб также можно вводить за 1, 2 или 3 недели до резекции (т.е. до получения образца опухоли у субъекта или пациента).

В некоторых вариантах осуществления пембролизумаб вводят для лечения рака шейки матки в дозе около 200 мг каждые 3 недели. В некоторых вариантах осуществления пембролизумаб вводят для лечения рака шейки матки в дозе около 400 мг каждые 6 недель. В некоторых вариантах осуществления введение пембролизумаба начинают через 1, 2, 3, 4 или 5 дней после введения IL-2. В некоторых вариантах осуществления введение пембролизумаба начинают через 1, 2 или 3 дня после введения IL-2. В некоторых вариантах осуществления пембролизумаб также можно вводить за 1, 2, 3, 4 или 5 недель до резекции (т.е. до получения образца опухоли у субъекта или пациента). В некоторых вариантах осуществления пембролизумаб также можно вводить за 1, 2 или 3 недели до резекции (т.е. до получения образца опухоли у субъекта или пациента).

В некоторых вариантах осуществления пембролизумаб вводят для лечения гепатоцеллюлярной карциномы (HCC) в дозе около 200 мг каждые 3 недели. В некоторых вариантах осуществления пембролизумаб вводят для лечения HCC в дозе около 400 мг каждые 6 недель. В некоторых вариантах осуществления введение пембролизумаба начинают через 1, 2, 3, 4 или 5 дней после введения IL-2. В некоторых вариантах осуществления введение пембролизумаба начинают через 1, 2 или 3 дня после введения IL-2. В некоторых вариантах осуществления пембролизумаб также можно вводить за 1, 2, 3, 4 или 5 недель до резекции (т.е. до получения образца опухоли у субъекта или пациента). В некоторых вариантах осуществления пембролизумаб также можно вводить за 1, 2 или 3 недели до резекции (т.е. до получения образца опухоли у субъекта или пациента).

В некоторых вариантах осуществления пембролизумаб вводят для лечения карциномы из клеток Меркеля (MCC) в дозе около 200 мг каждые 3 недели для взрослых. В некоторых вариантах осуществления пембролизумаб вводят для лечения MCC в дозе около 400 мг каждые 6 недель для взрослых. В некоторых вариантах осуществления пембролизумаб вводят для лечения MCC в дозе около 2 мг/кг (вплоть до 200 мг) каждые 3 недели в педиатрии. В некоторых вариантах осуществления введение пембролизумаба начинают через 1, 2, 3, 4 или 5 дней после введения IL-2. В некоторых вариантах осуществления введение пембролизумаба начинают через 1, 2 или 3 дня после введения IL-2. В некоторых вариантах осуществления пембролизумаб также можно вводить за 1, 2, 3, 4 или 5 недель до резекции (т.е. до получения образца опухоли у субъекта или пациента). В некоторых вариантах осуществления пембролизумаб также можно вводить за 1, 2 или 3 недели до резекции (т.е. до получения образца опухоли у субъекта или пациента). В некоторых вариантах осуществления введение пембролизумаба начинают через 1, 2, 3, 4 или 5 дней после введения IL-2. В некоторых вариантах осуществления введение пембролизумаба начинают через 1, 2 или 3 дня после введения IL-2. В некоторых вариантах осуществления пембролизумаб также можно вводить за 1, 2, 3, 4 или 5 недель до резекции (т.е. до получения образца опухоли у субъекта или пациента). В некоторых вариантах осуществления пембролизумаб также можно вводить за 1, 2 или 3 недели до резекции (т.е. до получения образца опухоли у субъекта или пациента).

В некоторых вариантах осуществления пембролизумаб вводят для лечения почечно-клеточного рака (RCC) в дозе около 200 мг каждые 3 недели. В некоторых вариантах осуществления пембролизумаб вводят для лечения RCC в дозе около 400 мг каждые 6 недель с акситинибом в дозе 5 мг перорально два раза в день. В некоторых вариантах осуществления введение пембролизумаба начинают через 1, 2, 3, 4 или 5 дней после введения IL-2. В некоторых вариантах осуществления введение пембролизумаба начинают через 1, 2 или 3 дня после введения IL-2. В некоторых вариантах осуществления пембролизумаб также можно вводить за 1, 2, 3, 4 или 5 недель до резекции (т.е. до получения образца опухоли у субъекта или пациента). В некоторых вариантах осуществления пембролизумаб также можно вводить за 1, 2 или 3 недели до резекции (т.е. до получения образца опухоли у субъекта или пациента).

В некоторых вариантах осуществления пембролизумаб вводят для лечения карциномы эндометрия в дозе около 200 мг каждые 3 недели. В некоторых вариантах осуществления пембролизумаб вводят для лечения карциномы эндометрия в дозе около 400 мг каждые 6 недель с ленватинибом в дозе 20 мг перорально один раз в день при опухолях, не являющихся MSI-H или dMMR. В некоторых вариантах осуществления введение пембролизумаба начинают через 1, 2, 3, 4 или 5 дней после введения IL-2. В некоторых вариантах осуществления введение пембролизумаба начинают через 1, 2 или 3 дня после введения IL-2. В некоторых вариантах осуществления пембролизумаб также можно вводить за 1, 2, 3, 4 или 5 недель до резекции (т.е. до получения образца опухоли у субъекта или пациента). В некоторых вариантах осуществления пембролизумаб также можно вводить за 1, 2 или 3 недели до резекции (т.е. до получения образца опухоли у субъекта или пациента).

В некоторых вариантах осуществления пембролизумаб вводят для лечения рака с высокой мутационной нагрузкой опухоли (TMB-H) в дозе около 200 мг каждые 3 недели для взрослых. В некоторых вариантах осуществления пембролизумаб вводят для лечения рака с TMB-H в дозе около 400 мг каждые 6 недель для взрослых. В некоторых вариантах осуществления пембролизумаб вводят для лечения рака с TMB-H в дозе около 2 мг/кг (вплоть до 200 мг) каждые 3 недели в педиатрии. В некоторых вариантах осуществления введение пембролизумаба начинают через 1, 2, 3, 4 или 5 дней после введения IL-2. В некоторых вариантах осуществления введение пембролизумаба начинают через 1, 2 или 3 дня после введения IL-2. В некоторых вариантах осуществления пембролизумаб также можно вводить за 1, 2, 3, 4 или 5 недель до резекции (т.е. до получения образца опухоли у субъекта или пациента). В некоторых вариан-

тах осуществления пембролизумаб также можно вводить за 1, 2 или 3 недели до резекции (т.е. до получения образца опухоли у субъекта или пациента).

В некоторых вариантах осуществления пембролизумаб вводят для лечения плоскоклеточной карциномы кожи (cSCC) в дозе около 200 мг каждые 3 недели. В некоторых вариантах осуществления пембролизумаб вводят для лечения cSCC в дозе около 400 мг каждые 6 недель. В некоторых вариантах осуществления введение пембролизумаба начинают через 1, 2, 3, 4 или 5 дней после введения IL-2. В некоторых вариантах осуществления введение пембролизумаба начинают через 1, 2 или 3 дня после введения IL-2. В некоторых вариантах осуществления пембролизумаб также можно вводить за 1, 2, 3, 4 или 5 недель до резекции (т.е. до получения образца опухоли у субъекта или пациента). В некоторых вариантах осуществления пембролизумаб также можно вводить за 1, 2 или 3 недели до резекции (т.е. до получения образца опухоли у субъекта или пациента).

В некоторых вариантах осуществления пембролизумаб вводят для лечения трижды негативного рака молочной железы (TNBC) в дозе около 200 мг каждые 3 недели. В некоторых вариантах осуществления пембролизумаб вводят для лечения TNBC в дозе около 400 мг каждые 6 недель. В некоторых вариантах осуществления введение пембролизумаба начинают через 1, 2, 3, 4 или 5 дней после введения IL-2. В некоторых вариантах осуществления введение пембролизумаба начинают через 1, 2 или 3 дня после введения IL-2. В некоторых вариантах осуществления пембролизумаб также можно вводить за 1, 2, 3, 4 или 5 недель до резекции (т.е. до получения образца опухоли у субъекта или пациента). В некоторых вариантах осуществления пембролизумаб также можно вводить за 1, 2 или 3 недели до резекции (т.е. до получения образца опухоли у субъекта или пациента).

В одном варианте осуществления, если пациент или субъект является взрослым, то есть лечение по показаниям для взрослых, можно применять дополнительный режим дозирования 400 мг каждые 6 недель. В некоторых вариантах осуществления введение пембролизумаба начинают через 1, 2, 3, 4 или 5 дней после введения IL-2. В некоторых вариантах осуществления введение пембролизумаба начинают через 1, 2 или 3 дня после введения IL-2. В некоторых вариантах осуществления пембролизумаб также можно вводить за 1, 2, 3, 4 или 5 недель до резекции (т.е. до получения образца опухоли у субъекта или пациента). В некоторых вариантах осуществления пембролизумаб также можно вводить за 1, 2 или 3 недели до резекции (т.е. до получения образца опухоли у субъекта или пациента).

В одном варианте осуществления ингибитор PD-1 представляет собой коммерчески доступное моноклональное антитело к PD-1, такое как клоны против m-PD-1 J43 (кат. № BE0033-2) и RMP1-14 (кат. № BE0146) (Bio X Cell, Inc., Западный Ливан, штат Нью-Гемпшир, США). Ряд коммерчески доступных антител к PD-1 известен специалистам в данной области техники.

В одном варианте осуществления ингибитор PD-1 представляет собой антитело, раскрытое в патенте США № 8354509 или публикациях заявок на патент США №№ 2010/0266617 A1, 2013/0108651 A1, 2013/0109843 A2, описание которых включено в настоящий документ посредством ссылки. В одном варианте осуществления ингибитор PD-1 представляет собой антитело к PD-1, описанное в патентах США №№ 8287856, 8580247 и 8168757 и публикациях заявок на патент США №№ 2009/0028857 A1, 2010/0285013 A1, 2013/0022600 A1 и 2011/0008369 A1, содержание которых включено в настоящий документ посредством ссылки. В другом варианте осуществления ингибитор PD-1 представляет собой антитело к PD-1, раскрытое в патенте США № 8735553 B1, описание которого включено в настоящий документ посредством ссылки. В одном варианте осуществления ингибитор PD-1 представляет собой пидилизумаб, также известный как CT-011, который описан в патенте США № 8686119, описание которого включено в настоящий документ посредством ссылки.

В одном варианте осуществления ингибитор PD-1 может представлять собой малую молекулу или пептид, или производное пептида, такие как описанные в патентах США №№ 8907053, 9096642, и 9044442 и публикации заявки на патент США № US 2015/0087581; соединения и производные 1,2,4-оксадиазола, такие как описанные в публикации заявки на патент США № 2015/0073024; циклические пептидомиметические соединения и производные, такие как, описанные в публикации заявки на патент США № US 2015/0073042; циклические соединения и производные, такие как описанные в публикации заявки на патент США № US 2015/0125491; соединения и производные 1,3,4-оксадиазола и 1,3,4-тиадиазола, такие как соединения, описанные в публикации международной патентной заявки № WO 2015/033301; соединения и производные на основе пептидов, такие как описанные в публикациях международных патентных заявок №№ WO 2015/036927 и WO 2015/04490, или соединения и производные на основе макроциклических пептидов, такие как описанные в публикации заявки на патент США № US 2014/0294898; описание каждой из которых из полностью включено в настоящий документ посредством ссылки. В одном варианте осуществления ингибитор PD-1 представляет собой цемиплимаб, коммерчески доступный от компании Regeneron, Inc.

В одном варианте осуществления ингибитор PD-L1 или PD-L2 может представлять собой любой ингибитор, антагонист или блокатор PD-L1 или PD-L2, известный в данной области техники. В частности, это один из ингибиторов, антагонистов или блокаторов PD-L1 или PD-L2, более подробно описанных в следующих абзацах. Термины "ингибитор", "антагонист" и "блокатор" применяются в настоящем документе взаимозаменяемо в отношении ингибиторов PD-L1 и PD-L2. Во избежание сомнений ссылки в

настоящем документе на ингибитор PD-L1 или PD-L2, который представляет собой антитело, могут относиться к соединению или его антигенсвязывающим фрагментам, вариантам, конъюгатам или биоаналогам. Во избежание сомнений ссылки в настоящем документе на ингибитор PD-L1 или PD-L2 могут относиться к соединению или его фармацевтически приемлемой соли, сложному эфиру, сольвату, гидрату, сокристаллу или пролекарству.

В некоторых вариантах осуществления композиции, процессы и способы, описанные в настоящем документе, включают ингибитор PD-L1 или PD-L2. В некоторых вариантах осуществления ингибитор PD-L1 или PD-L2 представляет собой небольшую молекулу. В предпочтительном варианте осуществления ингибитор PD-L1 или PD-L2 представляет собой антитело (т.е. антитело к PD-1), его фрагмент, включая Fab-фрагменты, или его одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv). В некоторых вариантах осуществления ингибитор PD-L1 или PD-L2 представляет собой поликлональное антитело. В предпочтительном варианте осуществления ингибитор PD-L1 или PD-L2 представляет собой моноклональное антитело. В некоторых вариантах осуществления ингибитор PD-L1 или PD-L2 конкурирует за связывание с PD-L1 или PD-L2 и/или связывается с эпитопом на PD-L1 или PD-L2. В одном варианте осуществления антитело конкурирует за связывание с PD-L1 или PD-L2 и/или связывается с эпитопом на PD-L1 или PD-L2.

В некоторых вариантах осуществления ингибиторы PD-L1, представленные в настоящем документе, являются селективными в отношении PD-L1, поскольку соединения связываются или взаимодействуют с PD-L1 при значительно более низких концентрациях, чем они связываются или взаимодействуют с другими рецепторами, включая рецептор PD-L2. В некоторых вариантах осуществления соединения связываются с рецептором PD-L1 с константой связывания, которая по меньшей мере приблизительно в 2 раза выше концентрации, приблизительно в 3 раза выше концентрации, приблизительно в 5 раз выше концентрации, приблизительно в 10 раз выше концентрации, приблизительно в 20 раз выше концентрации, приблизительно в 30 раз выше концентрации, приблизительно в 50 раз выше концентрации, приблизительно в 100 раз выше концентрации, приблизительно в 200 раз выше концентрации, приблизительно в 300 раз выше концентрации, или приблизительно в 500 раз выше концентрации, чем у рецептора PD-L2.

В некоторых вариантах осуществления ингибиторы PD-L2, представленные в настоящем документе, являются селективными в отношении PD-L2, поскольку соединения связываются или взаимодействуют с PD-L2 при значительно более низких концентрациях, чем они связываются или взаимодействуют с другими рецепторами, включая рецептор PD-L1. В некоторых вариантах осуществления соединения связываются с рецептором PD-L2 с константой связывания, которая по меньшей мере приблизительно в 2 раза выше концентрации, приблизительно в 3 раза выше концентрации, приблизительно в 5 раз выше концентрации, приблизительно в 10 раз выше концентрации, приблизительно в 20 раз выше концентрации, приблизительно в 30 раз выше концентрации, приблизительно в 50 раз выше концентрации, приблизительно в 100 раз выше концентрации, приблизительно в 200 раз выше концентрации, приблизительно в 300 раз выше концентрации, или приблизительно в 500 раз выше концентрации, чем у рецептора PD-L1.

Не ограничиваясь какой-либо теорией, считается, что опухолевые клетки экспрессируют PD-L1 и что Т-клетки экспрессируют PD-1. Однако экспрессия PD-L1 опухолевыми клетками не требуется для эффективности ингибиторов или блокаторов PD-1 или PD-L1. В одном варианте осуществления опухолевые клетки экспрессируют PD-L1. В другом варианте осуществления опухолевые клетки не экспрессируют PD-L1. В некоторых вариантах осуществления способы могут включать комбинацию PD-1 и антитела PD-L1, таких как описанные в настоящем документе, в комбинации с TIL. Введение комбинации PD-1 и антитела PD-L1 и TIL может быть одновременным или последовательным.

В некоторых вариантах осуществления ингибитор PD-L1 и/или PD-L2 представляет собой ингибитор, который связывает PD-L1 и/или PD-L2 человека с KD около 100 пМ или менее, связывает PD-L1 и/или PD-L2 человека с KD около 90 пМ или менее, связывает PD-L1 и/или PD-L2 человека с KD около 80 пМ или менее, связывает PD-L1 и/или PD-L2 человека с KD около 70 пМ или менее, связывает PD-L1 и/или PD-L2 человека с KD около 60 пМ или менее, KD около 50 пМ или менее, связывает PD-L1 и/или PD-L2 человека с KD около 40 пМ или менее, или связывает PD-L1 и/или PD-L2 человека с KD около 30 пМ или менее.

В некоторых вариантах осуществления ингибитор PD-L1 и/или PD-L2 представляет собой ингибитор, который связывается с PD-L1 и/или PD-L2 человека с kassoc около $7,5\times10^5$ л/мс или быстрее, связывается с PD-L1 и/или PD-L2 человека с kassoc около 8×10^5 л/мс или быстрее, связывается с человеческим PD-L1 и/или PD-L2 с kassoc около $8,5\times10^5$ л/мс или быстрее, связывается с PD-L1 и/или PD-L2 человека с kassoc около 9×10^5 л/мс или быстрее, связывается с PD-L1 и/или PD-L2 человека с kassoc около $9,5\times10^5$ л/мс и/или быстрее, или связывается с PD-L1 и/или PD-L2 человека с kassoc около 1×10^6 л/мс или быстрее.

В некоторых вариантах осуществления ингибитор PD-L1 и/или PD-L2 представляет собой ингибитор, который связывается с PD-L1 или PD-L2 человека с kdissoc около 2×10^{-5} л/с или медленнее, связыва-

ется с PD-1 человека, с kdissoc около $2,1\times10^{-5}$ л/с или медленнее, связывается с PD-1 человека с kdissoc около $2,2\times10^{-5}$ л/с или медленнее, связывается с PD-1 человека с kdissoc около $2,3\times10^{-5}$ л/с или медленнее, связывается с PD-1 человека с kdissoc около $2,4\times10^{-5}$ л/с или медленнее, связывается с PD-1 человека с kdissoc около $2,5\times10^{-5}$ л/с или медленнее, связывается с PD-1 человека с kdissoc около $2,6\times10^{-5}$ л/с или медленнее, связывается с PD-L1 или PD-L2 человека с kdissoc около $2,7\times10^{-5}$ л/с или медленнее, или связывается с PD-L1 или PD-L2 человека с kdissoc около 3×10^{-5} л/с или медленнее.

В некоторых вариантах осуществления ингибитор PD-L1 и/или PD-L2 представляет собой ингибитор, который блокирует или ингибирует связывание PD-L1 или PD-L2 человека с PD-1 человека с IC_{50} около 10 нМ или менее; блокирует или ингибирует связывание PD-L1 или PD-L2 человека с PD-1 человека с IC_{50} около 9 нМ или менее; блокирует или ингибирует связывание PD-L1 или PD-L2 человека с PD-1 человека с IC_{50} около 8 нМ или менее; блокирует или ингибирует связывание PD-L1 или PD-L2 человека с PD-1 человека с IC_{50} около 7 нМ или менее; блокирует или ингибирует связывание PD-L1 или PD-L2 человека с PD-1 человека с IC_{50} около 6 нМ или менее; блокирует или ингибирует связывание PD-L1 или PD-L2 человека с PD-1 человека с IC_{50} около 5 нМ или менее; блокирует или ингибирует связывание PD-L1 или PD-L2 человека с PD-1 человека с IC_{50} около 4 нМ или менее; блокирует или ингибирует связывание PD-L1 или PD-L2 человека с PD-1 человека с IC_{50} около 3 нМ или менее; блокирует или ингибирует связывание PD-L1 или PD-L2 человека с PD-1 человека с IC_{50} около 2 нМ или менее; или блокирует PD-1 человека, или блокирует связывание PD-L1 или PD-L2 человека с PD-1 человека с IC_{50} около 1 нМ или менее.

В одном варианте осуществления ингибитор PD-L1 представляет собой дурвалумаб, также известный как MEDI4736 (который коммерчески доступен от Medimmune, LLC, Гейтерсбург, штат Мэриленд, дочерняя компания AstraZeneca plc.), или его антигенсвязывающие фрагменты, конъюгаты или варианты. В одном варианте осуществления ингибитор PD-L1 представляет собой антитело, раскрытое в патенте США № 8779108 или публикации заявки на патент США №2013/0034559, описание которых включено в настоящий документ посредством ссылки. Клиническая эффективность дурвалумаба описана в публикации Page, et al., Ann. Rev. Med., 2014, 65, 185-202; Brahmer, et al., J. Clin. Oncol. 2014, 32, 5s (supplement, abstract 8021); и McDermott, et al., Cancer Treatment Rev., 2014, 40, 1056-64. Получение и свойства дурвалумаба описаны в патенте США № 8779108, описание которого включено в настоящий документ посредством ссылки. Аминокислотные последовательности дурвалумаба представлены в табл. 20. Моноклональное антитело дурвалумаб включает дисульфидные связи в положениях 22-96, 22"-96", 23'-89', 23'"-89'", 135'-195', 135'"-195'", 148-204, 148"-204", 215'-224, 215'"-224", 230-230", 233-233", 265-325, 265"-325", 371-429 и 371"-429'; и сайты N-гликозилирования в положениях Asn-301 и Asn-301".

В одном варианте осуществления ингибитор PD-L1 содержит тяжелую цепь, представленную SEQ ID NO: 178, и легкую цепь, представленную SEQ ID NO: 179. В одном варианте осуществления ингибитор PD-L1 содержит тяжелые и легкие цепи, имеющие последовательности, показанные в SEQ ID NO: 178 и SEQ ID NO: 179, соответственно, или антигенсвязывающие фрагменты, Fab-фрагменты, одноцепочечные вариабельные фрагменты (scFv), их варианты или конъюгаты. В одном варианте осуществления ингибитор PD-L1 содержит тяжелую и легкую цепи, каждая из которых по меньшей мере на 99% идентична последовательностям, показанным в SEQ ID NO: 178 и SEQ ID NO: 179 соответственно. В одном варианте осуществления ингибитор PD-L1 содержит тяжелую и легкую цепи, каждая из которых по меньшей мере на 98% идентична последовательностям, показанным в SEQ ID NO: 178 и SEQ ID NO: 179 соответственно. В одном варианте осуществления ингибитор PD-L1 содержит тяжелую и легкую цепи, каждая из которых по меньшей мере на 97% идентична последовательностям, показанным в SEQ ID NO: 178 и SEQ ID NO: 179 соответственно. В одном варианте осуществления ингибитор PD-L1 содержит тяжелую и легкую цепи, каждая из которых по меньшей мере на 96% идентична последовательностям, показанным в SEQ ID NO: 178 и SEQ ID NO: 179 соответственно. В одном варианте осуществления ингибитор PD-L1 содержит тяжелую и легкую цепи, каждая из которых по меньшей мере на 95% идентична последовательностям, показанным в SEQ ID NO: 178 и SEQ ID NO: 179 соответственно.

В одном варианте осуществления ингибитор PD-L1 содержит CDR тяжелой и легкой цепи или вариабельные области (VR) дурвалумаба. В одном варианте осуществления вариабельная область тяжелой цепи (V_H) ингибитора PD-L1 содержит последовательность, показанную в SEQ ID NO: 180, а вариабельная область легкой цепи (V_L) ингибитора PD-L1 содержит последовательность, показанную в SEQ ID NO: 181, или их консервативные аминокислотные замены. В одном варианте осуществления ингибитор PD-L1 содержит области V_H и V_L, каждая из которых по меньшей мере на 99% идентична последовательностям, показанным в SEQ ID NO: 180 и SEQ ID NO: 181 соответственно. В одном варианте осуществления ингибитор PD-L1 содержит области V_H и V_L, каждая из которых по меньшей мере на 98% идентична последовательностям, показанным в SEQ ID NO: 180 и SEQ ID NO: 181 соответственно. В одном варианте осуществления ингибитор PD-L1 содержит области V_H и V_L, каждая из которых по меньшей мере на 97% идентична последовательностям, показанным в SEQ ID NO: 180 и SEQ ID NO: 181 соответственно. В одном варианте осуществления ингибитор PD-L1 содержит области V_H и V_L, каждая из которых по меньшей мере на 96% идентична последовательностям, показанным в SEQ ID NO: 180 и SEQ ID

NO: 181 соответственно. В одном варианте осуществления ингибитор PD-L1 содержит области V_H и V_L, каждая из которых по меньшей мере на 95% идентична последовательностям, показанным в SEQ ID NO: 180 и SEQ ID NO: 181 соответственно.

В одном варианте осуществления ингибитор PD-L1 содержит домены CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, имеющие последовательности, указанные в SEQ ID NO: 182, SEQ ID NO: 183 и SEQ ID NO: 184 соответственно или их консервативные аминокислотные замены, и домены CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, имеющие последовательности, представленные в SEQ ID NO: 185, SEQ ID NO: 186 и SEQ ID NO: 187 соответственно, или их консервативные аминокислотные замены. В одном варианте осуществления антитело конкурирует за связывание и/или связывается с тем же эпитопом на PD-L1, что и любое из вышеупомянутых антител.

В одном варианте осуществления ингибитор PD-L1 представляет собой биоподобное моноклональное антитело к PD-L1, одобренное регулирующими органами по лекарственным средствам в отношении дурвалумаба. В одном варианте осуществления биоаналог содержит антитело к PD-L1, содержащее аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 97% идентичность последовательности, например, 97%, 98%, 99% или 100% идентичность последовательности с аминокислотной последовательностью референтного лекарственного средства или референтного биологического продукта, который содержит одну или более посттрансляционных модификаций в сравнении с референтным лекарственным средством или референтным биологическим продуктом, причем референтное лекарственное средство или референтный биологический продукт представляет собой дурвалумаб. В некоторых вариантах осуществления одна или более посттрансляционных модификаций выбраны из одного или более из следующего: гликозилирование, окисление, дезамидирование и укорочение. В некоторых вариантах осуществления биоаналог представляет собой антитело к PD-L1, разрешенное или поданное на регистрацию, причем антитело к PD-L1 предоставлено в составе, который отличается от составов референтного лекарственного средства или референтного биологического продукта, причем референтное лекарственное средство или референтный биологический продукт представляет собой дурвалумаб. Антитело к PD-L1 может быть разрешено регулирующим органом по лекарственным средствам, таким как FDA США и/или EMA Европейского Союза. В некоторых вариантах осуществления биоаналог представлен в виде композиции, которая дополнительно содержит одно или более вспомогательных веществ, причем одно или более вспомогательных веществ являются такими же или отличными от вспомогательных веществ, содержащихся в референтном лекарственном средстве или референтном биологическом продукте, причем референтное лекарственное средство или референтный биологический продукт представляет собой дурвалумаб. В некоторых вариантах осуществления биоаналог представлен в виде композиции, которая дополнительно содержит одно или более вспомогательных веществ, причем одно или более вспомогательных веществ являются такими же или отличными от вспомогательных веществ, содержащихся в референтном лекарственном средстве или референтном биологическом продукте, причем референтное лекарственное средство или референтный биологический продукт представляет собой дурвалумаб.

Таблица 20

Аминокислотные последовательности для ингибиторов PD-L1, связанных с дурвалумабом

Идентификатор	Последовательность (однобуквенные символы аминокислот)
SEQ ID NO:178 тяжелая цепь дурвалумаба	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS RYWMSWVRQA PGKGLEWVAN IKQDGSEKYY 60 VDSVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TAVYYCAREG GWFGELAFDY WGQGTLVTVS 120 SASTKGPSVF PLAPSSKSTS GGTAALGCLV KDYFPEPVTV SWNSGALTSG VHTFPAVLQS 180 SGLYSLSSVV TVPSSSLGTQ TYICNVNHKP SNTKVDKRVE PKSCDKTHTC PPCPAPEFEG 240 GPSVFLFPPK PKDTLMISRT PEVTCVVVDV SHEDPEVKFN WYVDGVEVHN AKTKPREEQY 300 NSTYRVVSVL TVLHQDWLNG KEYKCKVSNK ALPASIEKTI SKAKGQPREP QVYTLPPSRE 360 EMTKNQVSLT CLVKGFYPSD IAVEWESNGQ PENNYKTTPP VLDSDGSFFL YSKLTVDKSR 420 WQQGNVFSCS VMHEALHNHY TQKSLSLSPG K 451
SEQ ID NO:179 легкая цепь дурвалумаба	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS RYWMSWVRQA PGKGLEWVAN EIVLTQSPGT 60 LSLSPGERAT LSCRASQRVS SSYLAWYQQK PGQAPRLLIY DASSRATGIP DRFSGSGSGT 120 DFTLTISRLE PEDFAVYYCQ QYGSLPWTFG QGTKVEIKRT VAAPSVFIFP PSDEQLKSGT 180 ASVVCLLNNF YPREAKVQWK VDNALQSGNS QESVTEQDSK DSTYSLSSTL TLSKADYEKH 240 KVYACEVTHQ GLSSPVTKSF NRGEC 265

SEQ ID NO:180 вариабельная тяжелая цепь дурвалумаба	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS RYWMSWVRQA PGKGLEWVAN IKQDGSEKYY 60 VDSVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TAVYYCAREG GWFGELAFDY WGQGTLVTVS 120 S 121
SEQ ID NO:181 вариабельная легкая цепь дурвалумаба	EIVLTQSPGT LSLSPGERAT LSCRASQRVS SSYLAWYQQK PGQAPRLLIY DASSRATGIP 60 DRFSGSGSGT DFTLTISRLE PEDFAVYYCQ QYGSLPWTFG QGTKVEIK 108
SEQ ID NO:182 CDR1 тяжелой цепи дурвалумаба	RYWMS 5
SEQ ID NO:183 CDR2 тяжелой цепи дурвалумаба	NIKQDGSEKY YVDSVKG 17
SEQ ID NO:184 CDR3 тяжелой цепи дурвалумаба	EGGWFGELAF DY 12
SEQ ID NO:185 CDR1 легкой цепи дурвалумаба	RASQRVSSSY LA 12
SEQ ID NO:186 CDR2 легкой цепи дурвалумаба	DASSRAT 7
SEQ ID NO:187 CDR3 легкой цепи дурвалумаба	QQYGSLPWT 9

В одном варианте осуществления ингибитор PD-L1 представляет собой авелумаб, также известный как MSB0010718C (коммерчески доступный от Merck KGaA/EMD Serono), или его антигенсвязывающие фрагменты, конъюгаты или варианты. Получение и свойства авелумаба описаны в публикации заявки на патент США № US 2014/0341917 A1, описание которой специально включено в настоящий документ посредством ссылки. Аминокислотные последовательности авелумаба представлены в табл. 21. Авелумаб имеет дисульфидные связи внутри тяжелой цепи (C23-C104) в положениях 22-96, 147-203, 264-324, 370-428, 22"-96", 147"-203", 264"-324" и 370"-428"; дисульфидные связи внутри легкой цепи (C23-C104) в положениях 22'-90', 138'-197', 22'"-90'" и 138'"-197'"; дисульфидные связи внутри легкой цепи (h 5-CL 126) в положениях 223-215' и 223"-215'"; дисульфидные связи внутри тяжелой цепи (h 11, h 14) в положениях 229-229" и 232-232"; сайты N-гликозилирования (H CH2 N84.4) в положениях 300, 300"; фукозилированные сложные биантеннные гликаны CHO-типа; и отщепление C-концевого лизина H CHS K2 в положениях 450 и 450'.

В одном варианте осуществления ингибитор PD-L1 содержит тяжелую цепь, представленную SEQ ID NO: 188, и легкую цепь, представленную SEQ ID NO: 189. В одном варианте осуществления ингибитор PD-L1 содержит тяжелые и легкие цепи, имеющие последовательности, показанные в SEQ ID NO: 188 и SEQ ID NO: 189, соответственно, или антигенсвязывающие фрагменты, Fab-фрагменты, одноцепочечные вариабельные фрагменты (scFv), их варианты или конъюгаты. В одном варианте осуществления ингибитор PD-L1 содержит тяжелую и легкую цепи, каждая из которых по меньшей мере на 99% идентична последовательностям, показанным в SEQ ID NO: 188 и SEQ ID NO: 189 соответственно. В одном варианте осуществления ингибитор PD-L1 содержит тяжелую и легкую цепи, каждая из которых по меньшей мере на 98% идентична последовательностям, показанным в SEQ ID NO: 188 и SEQ ID NO: 189 соответственно. В одном варианте осуществления ингибитор PD-L1 содержит тяжелую и легкую цепи, каждая из которых по меньшей мере на 97% идентична последовательностям, показанным в SEQ ID NO: 188 и SEQ ID NO: 189 соответственно. В одном варианте осуществления ингибитор PD-L1 содержит тяжелую и легкую цепи, каждая из которых по меньшей мере на 96% идентична последовательностям, показанным в SEQ ID NO: 188 и SEQ ID NO: 189 соответственно. В одном варианте осуществления ингибитор PD-L1 содержит тяжелую и легкую цепи, каждая из которых по меньшей мере на 95% идентична последовательностям, показанным в SEQ ID NO: 188 и SEQ ID NO: 189 соответственно.

В одном варианте осуществления ингибитор PD-L1 содержит CDR тяжелой и легкой цепи или вариабельные области (VR) авелумаба. В одном варианте осуществления вариабельная область тяжелой цепи (V_H) ингибитора PD-L1 содержит последовательность, показанную в SEQ ID NO: 190, а вариабельная область легкой цепи (V_L) ингибитора PD-L1 содержит последовательность, показанную в SEQ ID NO: 191, или их консервативные аминокислотные замены. В одном варианте осуществления ингибитор PD-L1 содержит области V_H и V_L, каждая из которых по меньшей мере на 99% идентична последовательностям, показанным в SEQ ID NO: 190 и SEQ ID NO: 191 соответственно. В одном варианте осуществления ингибитор PD-L1 содержит области V_H и V_L, каждая из которых по меньшей мере на 98% идентична последовательностям, показанным в SEQ ID NO: 190 и SEQ ID NO: 191 соответственно. В одном варианте осуществления ингибитор PD-L1 содержит области V_H и V_L, каждая из которых по меньшей мере на 97% идентична последовательностям, показанным в SEQ ID NO: 190 и SEQ ID NO: 191 соответственно. В одном варианте осуществления ингибитор PD-L1 содержит области V_H и V_L, каждая из которых по меньшей мере на 96% идентична последовательностям, показанным в SEQ ID NO: 190 и SEQ ID NO: 191 соответственно. В одном варианте осуществления ингибитор PD-L1 содержит области V_H и V_L, каждая из которых по меньшей мере на 95% идентична последовательностям, показанным в SEQ ID NO: 190 и SEQ ID NO: 191 соответственно.

В одном варианте осуществления ингибитор PD-L1 содержит домены CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, имеющие последовательности, указанные в SEQ ID NO: 192, SEQ ID NO: 193 и SEQ ID NO: 194 соответственно или их консервативные аминокислотные замены, и домены CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, имеющие последовательности, представленные в SEQ ID NO: 195, SEQ ID NO: 196 и SEQ ID NO: 197 соответственно, или их консервативные аминокислотные замены. В одном варианте осуществления антитело конкурирует за связывание и/или связывается с тем же эпитопом на PD-L1, что и любое из вышеупомянутых антител.

В одном варианте осуществления ингибитор PD-L1 представляет собой биоподобное моноклональное антитело к PD-L1, одобренное регулирующими органами по лекарственным средствам в отношении авелумаба. В одном варианте осуществления биоаналог содержит антитело к PD-L1, содержащее аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 97% идентичность последовательности, например, 97%, 98%, 99% или 100% идентичность последовательности с аминокислотной последовательностью референтного лекарственного средства или референтного биологического продукта, который содержит одну или более посттрансляционных модификаций в сравнении с референтным лекарственным средством или референтным биологическим продуктом, причем референтное лекарственное средство или референтный биологический продукт представляет собой авелумаб. В некоторых вариантах осуществления одна или более посттрансляционных модификаций выбраны из одного или более из следующего: гликозилирование, окисление, дезамидирование и укорочение. В некоторых вариантах осуществления биоаналог представляет собой антитело к PD-L1, разрешенное или поданное на регистрацию, причем антитело к PD-L1 предоставлено в составе, который отличается от составов референтного лекарственного средства или референтного биологического продукта, причем референтное лекарственное средство или референтный биологический продукт представляет собой авелумаб. Антитело к PD-L1 может быть разрешено регулирующим органом по лекарственным средствам, таким как FDA США и/или EMA Европейского Союза. В некоторых вариантах осуществления биоаналог представлен в виде композиции, которая дополнительно содержит одно или более вспомогательных веществ, причем одно или более вспомогательных веществ являются такими же или отличными от вспомогательных веществ, содержащихся в референтном лекарственном средстве или референтном биологическом продукте, причем референтное лекарственное средство или референтный биологический продукт представляет собой авелумаб. В некоторых вариантах осуществления биоаналог представлен в виде композиции, которая дополнительно содержит одно или более вспомогательных веществ, причем одно или более вспомогательных

веществ являются такими же или отличными от вспомогательных веществ, содержащихся в референтном лекарственном средстве или референтном биологическом продукте, причем референтное лекарственное средство или референтный биологический продукт представляет собой авелумаб.

Таблица 21

Аминокислотные последовательности для ингибиторов PD-L1, связанных с авелумабом

Идентификатор	Последовательность (однобуквенные символы аминокислот)
SEQ ID NO:188 тяжелая цепь авелумаба	EVQLLESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS SYIMMWVRQA PGKGLEWVSS IYPSGGITFY 60 ADTVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCARIK LGTVTTVDYW GQGTLVTVSS 120 ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV HTFPAVLQSS 180 GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT YICNVNHKPS NTKVDKKVEP KSCDKTHTCP PCPAPELLGG 240 PSVFLFPPKP KDTLMISRTP EVTCVVVDVS HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQYN 300 STYRVVSVLT VLHQDWLNGK EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSRDE 360 LTKNQVSLTC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTPPV LDSDGSFFLY SKLTVDKSRW 420 QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPGK 450
SEQ ID NO:189 легкая цепь авелумаба	QSALTQPASV SGSPGQSITI SCTGTSSDVG GYNYVSWYQQ HPGKAPKLMI YDVSNRPSGV 60 SNRFSGSKSG NTASLTISGL QAEDEADYYC SSYTSSSTRV FGTGTKVTVL GQPKANPTVT 120 LFPPSSEELQ ANKATLVCLI SDFYPGAVTV AWKADGSPVK AGVETTKPSK QSNNKYAASS 180

	YLSLTPEQWK SHRSYSCQVT HEGSTVEKTV APTECS 216
SEQ ID NO:190 легкая цепь дурвалумаба	EVQLLESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS SYIMMWVRQA PGKGLEWVSS IYPSGGITFY 60 ADTVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCARIK LGTVTTVDYW GQGTLVTVSS 120
SEQ ID NO:191 вариабельная легкая цепь авелумаба	QSALTQPASV SGSPGQSITI SCTGTSSDVG GYNYVSWYQQ HPGKAPKLMI YDVSNRPSGV 60 SNRFSGSKSG NTASLTISGL QAEDEADYYC SSYTSSSTRV FGTGTKVTVL 110
SEQ ID NO:192 CDR1 легкой цепи авелумаба	SYIMM 5
SEQ ID NO:193 CDR2 тяжелой цепи авелумаба	SIYPSGGITF YADTVKG 17
SEQ ID NO:194 CDR3 тяжелой цепи авелумаба	IKLGTVTTVD Y 11
SEQ ID NO:195 CDR1 легкой цепи авелумаба	TGTSSDVGGY NYVS 14
SEQ ID NO:196 CDR2 легкой цепи авелумаба	DVSNRPS 7
SEQ ID NO:197 CDR3 легкой цепи авелумаба	SSYTSSSTRV 10

В одном варианте осуществления ингибитор PD-L1 представляет собой атезолизумаб, также известный как MPDL3280A или RG7446 (коммерчески доступный как TECENTRIQ от Genentech, Inc., дочерней компании Roche Holding AG, Базель, Швейцария), или его антигенсвязывающие фрагменты, конъюгаты или их варианты. В одном варианте осуществления ингибитор PD-L1 представляет собой антитело, описанное в патенте США № 8217149, описание которого специально включено в настоящий документ посредством ссылки. В одном варианте осуществления ингибитор PD-L1 представляет собой антитело, описанное в публикациях патентных заявок США №№ 2010/0203056 A1, 2013/0045200 A1, 2013/0045201 A1, 2013/0045202 A1 или 2014/0065135 A1, описание которых специально включено в настоящий документ посредством ссылки. Получение и свойства атезолизумаба описаны в патенте США № 8217149, описание которого включено в настоящий документ посредством ссылки. Аминокислотные последовательности атезолизумаба представлены в табл. 22. Атезолизумаб имеет дисульфидные связи внутри тяжелой цепи (C23-C104) в положениях 22-96, 145-201, 262-322, 368-426, 22"-96", 145"-201", 262"-322" и 368"-426"; дисульфидные связи внутри легкой цепи (C23-C104) в положениях 23'-88', 134'-194', 23'"-88'" и 134'"-194'"; дисульфидные связи внутри легкой цепи (h 5-CL 126) в положениях 221-214' и 221"-214'"; дисульфидные связи внутри тяжелой цепи (h 11, h 14) в положениях 227-227" и 230-230"; и сайты N-гликозилирования (H CH2 N84.4>A) в положениях 298 и 298'.

В одном варианте осуществления ингибитор PD-L1 содержит тяжелую цепь, представленную SEQ ID NO: 198, и легкую цепь, представленную SEQ ID NO: 199. В одном варианте осуществления ингибитор PD-L1 содержит тяжелые и легкие цепи, имеющие последовательности, показанные в SEQ ID NO: 198 и SEQ ID NO: 199, соответственно, или антигенсвязывающие фрагменты, Fab-фрагменты, одноцепо-

чечные вариабельные фрагменты (scFv), их варианты или конъюгаты. В одном варианте осуществления ингибитор PD-L1 содержит тяжелую и легкую цепи, каждая из которых по меньшей мере на 99% идентична последовательностям, показанным в SEQ ID NO: 198 и SEQ ID NO: 199 соответственно. В одном варианте осуществления ингибитор PD-L1 содержит тяжелую и легкую цепи, каждая из которых по меньшей мере на 98% идентична последовательностям, показанным в SEQ ID NO: 198 и SEQ ID NO: 199 соответственно. В одном варианте осуществления ингибитор PD-L1 содержит тяжелую и легкую цепи, каждая из которых по меньшей мере на 97% идентична последовательностям, показанным в SEQ ID NO: 198 и SEQ ID NO: 199 соответственно. В одном варианте осуществления ингибитор PD-L1 содержит тяжелую и легкую цепи, каждая из которых по меньшей мере на 96% идентична последовательностям, показанным в SEQ ID NO: 198 и SEQ ID NO: 199 соответственно. В одном варианте осуществления ингибитор PD-L1 содержит тяжелую и легкую цепи, каждая из которых по меньшей мере на 95% идентична последовательностям, показанным в SEQ ID NO: 198 и SEQ ID NO: 199 соответственно.

В одном варианте осуществления ингибитор PD-L1 содержит CDR тяжелой и легкой цепи или вариабельные области (VR) атезолизумаба. В одном варианте осуществления вариабельная область тяжелой цепи (V_H) ингибитора PD-L1 содержит последовательность, показанную в SEQ ID NO: 200, а вариабельная область легкой цепи (V_L) ингибитора PD-L1 содержит последовательность, показанную в SEQ ID NO: 201, или их консервативные аминокислотные замены. В одном варианте осуществления ингибитор PD-L1 содержит области V_H и V_L, каждая из которых по меньшей мере на 99% идентична последовательностям, показанным в SEQ ID NO: 200 и SEQ ID NO: 201 соответственно. В одном варианте осуществления ингибитор PD-L1 содержит области V_H и V_L, каждая из которых по меньшей мере на 98% идентична последовательностям, показанным в SEQ ID NO: 200 и SEQ ID NO: 201 соответственно. В одном варианте осуществления ингибитор PD-L1 содержит области V_H и V_L, каждая из которых по меньшей мере на 97% идентична последовательностям, показанным в SEQ ID NO: 200 и SEQ ID NO: 201 соответственно. В одном варианте осуществления ингибитор PD-L1 содержит области V_H и V_L, каждая из которых по меньшей мере на 96% идентична последовательностям, показанным в SEQ ID NO: 200 и SEQ ID NO: 201 соответственно. В одном варианте осуществления ингибитор PD-L1 содержит области V_H и V_L, каждая из которых по меньшей мере на 95% идентична последовательностям, показанным в SEQ ID NO: 200 и SEQ ID NO: 201 соответственно.

В одном варианте осуществления ингибитор PD-L1 содержит домены CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, имеющие последовательности, указанные в SEQ ID NO: 202, SEQ ID NO: 203 и SEQ ID NO: 204 соответственно или их консервативные аминокислотные замены, и домены CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, имеющие последовательности, представленные в SEQ ID NO: 205, SEQ ID NO: 206 и SEQ ID NO: 207 соответственно, или их консервативные аминокислотные замены. В одном варианте осуществления антитело конкурирует за связывание и/или связывается с тем же эпитопом на PD-L1, что и любое из вышеупомянутых антител.

В одном варианте осуществления антитело к PD-L1 представляет собой биоподобное моноклональное антитело к PD-L1, одобренное регулирующими органами по лекарственным средствам в отношении атезолизумаба. В одном варианте осуществления биоаналог содержит антитело к PD-L1, содержащее аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 97% идентичность последовательности, например, 97%, 98%, 99% или 100% идентичность последовательности с аминокислотной последовательностью референтного лекарственного средства или референтного биологического продукта, который содержит одну или более посттрансляционных модификаций в сравнении с референтным лекарственным средством или референтным биологическим продуктом, причем референтное лекарственное средство или референтный биологический продукт представляет собой атезолизумаб. В некоторых вариантах осуществления одна или более посттрансляционных модификаций выбраны из одного или более из следующего: гликозилирование, окисление, дезамидирование и укорочение. В некоторых вариантах осуществления биоаналог представляет собой антитело к PD-L1, разрешенное или поданное на регистрацию, причем антитело к PD-L1 предоставлено в составе, который отличается от составов референтного лекарственного средства или референтного биологического продукта, причем референтное лекарственное средство или референтный биологический продукт представляет собой атезолизумаб. Антитело к PD-L1 может быть разрешено регулирующим органом по лекарственным средствам, таким как FDA США и/или EMA Европейского Союза. В некоторых вариантах осуществления биоаналог представлен в виде композиции, которая дополнительно содержит одно или более вспомогательных веществ, причем одно или более вспомогательных веществ являются такими же или отличными от вспомогательных веществ, содержащихся в референтном лекарственном средстве или референтном биологическом продукте, причем референтное лекарственное средство или референтный биологический продукт представляет собой атезолизумаб. В некоторых вариантах осуществления биоаналог представлен в виде композиции, которая дополнительно содержит одно или более вспомогательных веществ, причем одно или более вспомогательных веществ являются такими же или отличными от вспомогательных веществ, содержащихся в референтном лекарственном средстве или референтном биологическом продукте, причем референтное лекарственное средство или референтный биологический продукт представляет собой атезолизумаб.

Таблица 22

Аминокислотные последовательности для ингибиторов PD-L1, связанных с атезолизумабом

Идентификатор	Последовательность (однобуквенные символы аминокислот)
SEQ ID NO:198 тяжелая цепь атезолизумаба	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS DSWIHWVRQA PGKGLEWVAW ISPYGGSTYY 60 ADSVKGRFTI SADTSKNTAY LQMNSLRAED TAVYYCARRH WPGGFDYWGQ GTLVTVSSAS 120 TKGPSVFPLA PSSKSTSGGT AALGCLVKDY FPEPVTVSWN SGALTSGVHT FPAVLQSSGL 180 YSLSSVVTVP SSSLGTQTYI CNVNHKPSNT KVDKKVEPKS CDKTHTCPPC PAPELLGGPS 240 VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYAST 300 YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP APIEKTISKA KGQPREPQVY TLPPSREEMT 360 KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTPPVLD SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ 420 GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPGK 448
SEQ ID NO:199 легкая цепь атезолизумаба	DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQDVS TAVAWYQQKP GKAPKLLIYS ASFLYSGVPS 60 RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ YLYHPATFGQ GTKVEIKRTV AAPSVFIFPP 120 SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQWKV DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYSLSSTLT 180 LSKADYEKHK VYACEVTHQG LSSPVTKSFN RGEC 214
SEQ ID NO:200	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS DSWIHWVRQA

вариабельная тяжелая цепь атезолизумаба	PGKGLEWVAW ISPYGGSTYY 60 ADSVKGRFTI SADTSKNTAY LQMNSLRAED TAVYYCARRH WPGGFDYWGQ GTLVTVSA 118
SEQ ID NO:201 вариабельная легкая цепь атезолизумаба	DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQDVS TAVAWYQQKP GKAPKLLIYS ASFLYSGVPS 60 RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ YLYHPATFGQ GTKVEIKR 108
SEQ ID NO:202 CDR1 тяжелой цепи атезолизумаба	GFTFSDSWIH 10
SEQ ID NO:203 CDR2 тяжелой цепи атезолизумаба	AWISPYGGST YYADSVKG 18
SEQ ID NO:204 CDR3 тяжелой цепи атезолизумаба	RHWPGGFDY 9
SEQ ID NO:205 CDR1 легкой цепи атезолизумаба	RASQDVSTAV A 11
SEQ ID NO:206 CDR2 легкой цепи атезолизумаба	SASFLYS 7
SEQ ID NO:207 CDR3 легкой цепи атезолизумаба	QQYLYHPAT 9

В одном варианте осуществления ингибиторы PD-L1 включают антитела, описанные в публикации заявки на патент США № US 2014/0341917 A1, описание которой включено в настоящий документ посредством ссылки. В другом варианте осуществления также включены антитела, которые конкурируют с любым из этих антител за связывание с PD-L1. В одном варианте осуществления антитело к PD-L1 представляет собой MDX-1105, также известное как BMS-935559, которое описано в патенте США № US 7943743, описание которого включено в настоящий документ посредством ссылки. В одном варианте осуществления антитело к PD-L1 выбрано из антител к PD-L1, описанных в патенте США № US 7943743, которые включены в настоящий документ посредством ссылки.

В одном варианте осуществления ингибитор PD-L1 представляет собой коммерчески доступное моноклональное антитело, такое как INVIVOMAB анти-m-PD-L1 клон 10F.9G2 (каталожный номер BE0101, Bio X Cell, Inc., Западный Ливан, штат Нью-Гэмпшир, США). В одном варианте осуществления антитело к PD-L1 представляет собой коммерчески доступное моноклональное антитело, такое как AFFYMETRIX EBIOSCIENCE (MIH1). Ряд коммерчески доступных антител к PD-L1 известен специалистам в данной области техники.

В одном варианте осуществления ингибитор PD-L2 представляет собой коммерчески доступное моноклональное антитело, такое как BIOLEGEND 24F.10C12 Mouse IgG2a, изотип к (каталожный № 329602 Biolegend, Inc., Сан-Диего, штат Калифорния), антитело SIGMA к PD-L2. (каталожный номер SAB3500395, Sigma-Aldrich Co., Сент-Луис, штат Миссури) или другие коммерчески доступные антитела

к PD-L2, известные специалистам в данной области техники.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение включает способ лечения пациента, страдающего от рака, включающий этапы применения схемы TIL, причем схема TIL включает продукт TIL, генетически модифицированный для экспрессии CCR, дополнительно включающий этап введения либо ингибитора PD-1, либо ингибитора PD-L1. В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение включает композицию, содержащую: (i) продукт TIL, генетически модифицированный для экспрессии CCR, и (ii) либо ингибитор PD-1, либо ингибитор PD-L1. В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение включает набор, содержащий: (i) продукт TIL, генетически модифицированный для экспрессии CCR, и (ii) либо ингибитор PD-1, либо ингибитор PD-L1.

3. Комбинации с ингибиторами CTLA-4.

В некоторых вариантах осуществления терапия TIL, предоставляемая пациентам, страдающих от рака, может включать лечение только терапевтическими популяциями TIL или может включать комбинированное лечение, включающее TIL и один или более ингибиторов CTLA-4.

Цитотоксический антиген 4 Т-лимфоцитов (CTLA-4) является членом суперсемейства иммуноглобулинов и экспрессируется на поверхности Т-хелперов. CTLA-4 представляет собой негативный регулятор CD28-зависимой активации Т-клеток и действует как контрольная точка для адаптивных иммунных ответов. Подобно Т-клеточному костимуляторному белку CD28, антиген, связывающий CTLA-4, представляет CD80 и CD86 на клетках. CTLA-4 доставляет супрессорный сигнал Т-клеткам, тогда как CD28 доставляет стимулирующий сигнал. Человеческие антитела к CTLA-4 человека описаны как иммуностимулирующие модуляторы при многих болезненных состояниях, таких как лечение или профилактика вирусных и бактериальных инфекций и лечение рака (WO 01/14424 и WO 00/37504). Ряд полностью человеческих моноклональных антител (mAb) к CTLA-4 человека был изучен в клинических испытаниях для лечения различных типов солидных опухолей, включая, помимо прочего, ипилимумаб (MDX-010) и тремелимумаб (CP-675206).

В некоторых вариантах осуществления ингибитор CTLA-4 может представлять собой любой ингибитор CTLA-4 или блокатор CTLA-4, известный в данной области техники. В частности, это один из ингибиторов или блокаторов CTLA-4, более подробно описанных в следующих абзацах. Термины "ингибитор", "антагонист" и "блокатор" применяются в настоящем документе взаимозаменяемо в отношении ингибиторов CTLA-4. Во избежание сомнений ссылки в настоящем документе на ингибитор CTLA-4, который представляет собой антитело, могут относиться к соединению или его антигенсвязывающим фрагментам, вариантам, конъюгатам или биоаналогам. Во избежание сомнений ссылки в настоящем документе на ингибитор CTLA-4 могут также относиться к низкомолекулярному соединению или его фармацевтически приемлемой соли, сложному эфиру, сольвату, гидрату, сокристаллу или пролекарству.

Подходящие ингибиторы CTLA-4 для применения в способах по настоящему изобретению включают, помимо прочего, антитела к CTLA-4, антитела к CTLA-4 человека, антитела к CTLA-4 мыши, антитела к CTLA-4 млекопитающих, гуманизированные антитела к CTLA-4, моноклональные антитела к CTLA-4, поликлональные антитела к CTLA-4, химерные антитела к CTLA-4, MDX-010 (ипилимумаб), тремелимумаб, антитела к CD28, антитела к CTLA-4 аднектина, доменные антитела к CTLA-4, одноцепочечные фрагменты анти-CTLA-4, фрагменты тяжелой цепи анти-CTLA-4, фрагменты легкой цепи анти-CTLA-4, ингибиторы CTLA-4, которые агонизируют костимулирующий путь, антитела, описанные в публикации PCT № WO 2001/014424, антитела, описанные в публикации PCT № WO 2004/035607, антитела, описанные в публикации США № 2005/0201994, и антитела, описанные в выданном европейском патенте № EP. 1212422 B1, описание каждого из которых включено в настоящий документ посредством ссылки. Дополнительные антитела к CTLA-4 описаны в патентах США №№ 5811097, 5855887, 6051227 и 6984720; в публикациях PCT № WO 01/14424 и WO 00/37504; и в публикациях США №№ 2002/0039581 и 2002/086014, описание каждого из которых включено в настоящий документ посредством ссылки. Другие антитела к CTLA-4, которые можно применять в способе по настоящему изобретению, включают, например, антитела, описанные в следующих публикациях: WO 98/42752; патенты США №№ 6682736 и 6207156; Hurwitz et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95(17): 10067-10071 (1998); Camacho et al., J. Clin. Oncology, 22(145): Abstract No. 2505 (2004) (антитело CP-675206); Mokyr et al., Cancer Res., 58:5301-5304 (1998), и патент США №№ 5977318, 6682736, 7109003 и 7132281, описание каждой из которых включено в настоящий документ посредством ссылки.

Дополнительные ингибиторы CTLA-4 включают, помимо прочего следующее: любой ингибитор, который способен нарушать способность антигена CD28 связываться с его родственным лигандом, ингибировать способность CTLA-4 связываться с родственным ему лигандом, усиливать ответы Т-клеток через костимулирующий путь, нарушать способность B7 связываться с CD28 и/или CTLA-4, нарушать способность B7 активировать костимулирующий путь, нарушать способность CD80 связываться с CD28 и/или CTLA-4, нарушать способность CD80 активировать костимулирующий путь, нарушать способность CD86 связываться с CD28 и/или CTLA-4, нарушать способность CD86 активировать костимулирующий путь и для нарушать костимулирующий путь в целом от его активации. Это обязательно включает низкомолекулярные ингибиторы CD28, CD80, CD86, CTLA-4, среди других участников костимулирующего пути; антитела, направленные против CD28, CD80, CD86, CTLA-4, среди других членов кости-

мулирующего пути; антисмысловые молекулы, направленные против CD28, CD80, CD86, CTLA-4, среди других членов костимулирующего пути; аднектины, направленные против CD28, CD80, CD86, CTLA-4, среди других членов костимулирующего пути, ингибиторы РНКи (как одноцепочечные, так и двухцепочечные) CD28, CD80, CD86, CTLA-4, среди других участников костимулирующего пути, среди других ингибиторов CTLA-4.

В некоторых вариантах осуществления ингибитор CTLA-4 связывается с CTLA-4 с K_d около 10^{-6} М или менее, 10^{-7} М или менее, 10^{-8} или менее, 10^{-9} М или менее, 10^{-10} М или менее, 10^{-11} М или менее, 10^{-12} М или менее, например, от 10^{-13} М до 10^{-16} М, или в пределах любого диапазона, имеющего любые два из вышеупомянутых значений в качестве конечных точек. В некоторых вариантах осуществления ингибитор CTLA-4 связывается с CTLA-4 с K_d не более чем в 10 раз больше, чем у ипилимумаба, при сравнении с помощью того же анализа. В некоторых вариантах осуществления ингибитор CTLA-4 связывается с CTLA-4 с K_d примерно таким же или меньшим (например, до 10 раз меньше или до 100 раз меньше), чем у ипилимумаба, при сравнении с помощью того же анализа. В некоторых вариантах осуществления значения IC_{50} для ингибирования ингибитором CTLA-4 связывания CTLA-4 с CD80 или CD86 не более чем в 10 раз превышают значения для опосредованного ипилимумабом ингибирования связывания CTLA-4 с CD80 или CD86 соответственно при сравнении с помощью того же анализа. В некоторых вариантах осуществления значения IC_{50} для ингибирования ингибитором CTLA-4 связывания CTLA-4 с CD80 или CD86 примерно такие же или меньше (например, до 10 раз меньше или до 100 раз меньше), чем опосредованного ипилимумабом ингибирования связывания CTLA-4 с CD80 или CD86 соответственно при сравнении с помощью того же анализа.

В некоторых вариантах осуществления ингибитор CTLA-4 применяется в количестве, достаточном для ингибирования экспрессии и/или снижения биологической активности CTLA-4 на по меньшей мере 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% или 100% относительно подходящего контроля, например, от 50% до 75%, от 75% до 90% или от 90% до 100%. В некоторых вариантах осуществления ингибитор пути CTLA-4 применяется в количестве, достаточном для снижения биологической активности CTLA-4 за счет снижения связывания CTLA-4 с CD80, CD86 или обоими по меньшей мере на 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% или 100% относительно подходящего контроля, например, от 50% до 75%, от 75% до 90% или от 90% до 100% относительно подходящего контроля. Подходящим контролем в контексте оценки или количественного определения эффекта интересующего агента обычно является сопоставимая биологическая система (например, клетки или субъект), которая не подвергалась воздействию или лечению интересующим агентом, например, ингибитор пути CTLA-4 (или подвергалась воздействию или лечению в незначительном количестве). В некоторых вариантах осуществления биологическая система может служить в качестве собственного контроля (например, биологическая система может быть оценена до воздействия или лечения агентом и сравнена с состоянием после начала или окончания воздействия или лечения. В некоторых вариантах осуществления может применяться исторический контроль.

В одном варианте осуществления ингибитор CTLA-4 представляет собой ипилимумаб (коммерчески доступный как Yervoy от Bristol-Myers Squibb Co.) или его биоаналоги, антигенсвязывающие фрагменты, конъюгаты или варианты. Как известно в данной области техники, ипилимумаб относится к антителу к CTLA-4, полностью человеческому антителу IgGκ, полученному от трансгенной мыши с человеческими генами, кодирующими тяжелые и легкие цепи, для создания функционального человеческого репертуара. Ипилимумаб также может упоминаться по регистрационному номеру CAS 477202-00-9 и в публикации PCT WO 01/14424, которая полностью включена в настоящий документ посредством ссылки для всех целей. Он описан как антитело 10DI. В частности, ипилимумаб содержит вариабельную область легкой цепи и вариабельную область тяжелой цепи (с вариабельной областью легкой цепи, содержащей SEQ ID NO: 211, и с вариабельной областью тяжелой цепи, содержащей SEQ ID NO: 210). Фармацевтическая композиция ипилимумаба включает все фармацевтически приемлемые композиции, содержащие ипилимумаб и один или более разбавителей, носителей или вспомогательных веществ. Пример фармацевтической композиции, содержащей ипилимумаб, описан в публикации международной патентной заявки № WO 2007/67959. Ипилимумаб можно вводить внутривенно (в/в).

В одном варианте осуществления ингибитор CTLA-4 содержит тяжелую цепь, представленную SEQ ID NO: 208, и легкую цепь, представленную SEQ ID NO: 209. В одном варианте осуществления ингибитор CTLA-4 содержит тяжелые и легкие цепи, имеющие последовательности, показанные в SEQ ID NO: 208 и SEQ ID NO: 209, соответственно, или антигенсвязывающие фрагменты, Fab-фрагменты, одноцепочечные вариабельные фрагменты (scFv), их варианты или конъюгаты. В одном варианте осуществления ингибитор CTLA-4 содержит тяжелую и легкую цепи, каждая из которых по меньшей мере на 99% идентична последовательностям, показанным в SEQ ID NO: 208 и SEQ ID NO: 209 соответственно. В одном варианте осуществления ингибитор CTLA-4 содержит тяжелую и легкую цепи, каждая из которых по меньшей мере на 98% идентична последовательностям, показанным в SEQ ID NO: 208 и SEQ ID NO: 209 соответственно. В одном варианте осуществления ингибитор CTLA-4 содержит тяжелую и легкую цепи, каждая из которых по меньшей мере на 97% идентична последовательностям, показанным в SEQ ID NO: 208 и SEQ ID NO: 209 соответственно. В одном варианте осуществления ингибитор CTLA-4 содержит

тяжелую и легкую цепи, каждая из которых по меньшей мере на 96% идентична последовательностям, показанным в SEQ ID NO: 208 и SEQ ID NO: 209 соответственно. В одном варианте осуществления ингибитор CTLA-4 содержит тяжелую и легкую цепи, каждая из которых по меньшей мере на 95% идентична последовательностям, показанным в SEQ ID NO: 208 и SEQ ID NO: 209 соответственно.

В одном варианте осуществления ингибитор CTLA-4 содержит CDR тяжелой и легкой цепи или вариабельные области (VR) ипилимумаба. В одном варианте осуществления вариабельная область тяжелой цепи (V_H) ингибитора CTLA-4 содержит последовательность, показанную в SEQ ID NO: 210, а вариабельная область легкой цепи (V_L) ингибитора CTLA-4 содержит последовательность, показанную в SEQ ID NO: 211, или их консервативные аминокислотные замены. В одном варианте осуществления ингибитор CTLA-4 содержит области V_H и V_L, каждая из которых по меньшей мере на 99% идентична последовательностям, показанным в SEQ ID NO: 210 и SEQ ID NO: 211 соответственно. В одном варианте осуществления ингибитор CTLA-4 содержит области V_H и V_L, каждая из которых по меньшей мере на 98% идентична последовательностям, показанным в SEQ ID NO: 210 и SEQ ID NO: 211 соответственно. В одном варианте осуществления ингибитор CTLA-4 содержит области V_H и V_L, каждая из которых по меньшей мере на 97% идентична последовательностям, показанным в SEQ ID NO: 210 и SEQ ID NO: 211 соответственно. В одном варианте осуществления ингибитор CTLA-4 содержит области V_H и V_L, каждая из которых по меньшей мере на 96% идентична последовательностям, показанным в SEQ ID NO: 210 и SEQ ID NO: 211 соответственно. В одном варианте осуществления ингибитор CTLA-4 содержит области V_H и V_L, каждая из которых по меньшей мере на 95% идентична последовательностям, показанным в SEQ ID NO: 210 и SEQ ID NO: 211 соответственно.

В одном варианте осуществления ингибитор CTLA-4 содержит домены CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, имеющие последовательности, указанные в SEQ ID NO: 212, SEQ ID NO: 213 и SEQ ID NO: 214 соответственно или их консервативные аминокислотные замены, и домены CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, имеющие последовательности, представленные в SEQ ID NO: 215, SEQ ID NO: 216 и SEQ ID NO: 217 соответственно, или их консервативные аминокислотные замены. В одном варианте осуществления антитело конкурирует за связывание и/или связывается с тем же эпитопом на CTLA-4, что и любое из вышеупомянутых антител.

В одном варианте осуществления ингибитор CTLA-4 представляет собой биоподобное моноклональное антитело CTLA-4, одобренное регулирующими органами по лекарственным средствам в отношении ипилимумаба. В одном варианте осуществления биоаналог содержит антитело к CTLA-4, содержащее аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 97% идентичность последовательности, например, 97%, 98%, 99% или 100% идентичность последовательности с аминокислотной последовательностью референтного лекарственного средства или референтного биологического продукта, который содержит одну или более посттрансляционных модификаций в сравнении с референтным лекарственным средством или референтным биологическим продуктом, причем референтное лекарственное средство или референтный биологический продукт представляет собой ипилимумаб. В некоторых вариантах осуществления одна или более посттрансляционных модификаций выбраны из одного или более из следующего: гликозилирование, окисление, дезамидирование и укорочение. Аминокислотные последовательности ипилимумаба представлены в табл. 23. В некоторых вариантах осуществления биоаналог представляет собой антитело к CTLA-4, разрешенное или поданное на регистрацию, причем антитело к CTLA-4 предоставлено в составе, который отличается от составов референтного лекарственного средства или референтного биологического продукта, причем референтное лекарственное средство или референтный биологический продукт представляет собой ипилимумаб. Антитело к CTLA-4 может быть разрешено регулирующим органом по лекарственным средствам, таким как FDA США и/или EMA Европейского Союза. В некоторых вариантах осуществления биоаналог представлен в виде композиции, которая дополнительно содержит одно или более вспомогательных веществ, причем одно или более вспомогательных веществ являются такими же или отличными от вспомогательных веществ, содержащихся в референтном лекарственном средстве или референтном биологическом продукте, причем референтное лекарственное средство или референтный биологический продукт представляет собой ипилимумаб. В некоторых вариантах осуществления биоаналог представлен в виде композиции, которая дополнительно содержит одно или более вспомогательных веществ, причем одно или более вспомогательных веществ являются такими же или отличными от вспомогательных веществ, содержащихся в референтном лекарственном средстве или референтном биологическом продукте, причем референтное лекарственное средство или референтный биологический продукт представляет собой ипилимумаб.

Таблица 23

Аминокислотные последовательности ипилимумаба

Идентификатор	Последовательность (однобуквенные символы аминокислот)
SEQ ID NO:208 тяжелая цепь ипилимумаба	QVQLVESGGG VVQPGRSLRL SCAASGFTFS SYTMHWVRQA PGKGLEWVTF ISYDGNNKYY 60 ADSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAIYYCARTG WLGPFDYWGQ GTLVTVSSAS 120 TKGPSVFPLA PSSKSTSGGT AALGCLVKDY FPEPVTVSWN SGALTSGVHT FPAVLQSSGL 180 YSLSSVVTVP SSSLGTQTYI CNVNHKPSNT KVDKRVEPKS CDKTH 225
SEQ ID NO:209 легкая цепь	EIVLTQSPGT LSLSPGERAT LSCRASQSVG SSYLAWYQQK PGQAPRLLIY GAFSRATGIP 60

ипилимумаба	DRFSGSGSGT DFTLTISRLE PEDFAVYYCQ QYGSSPWTFG QGTKVEIKRT VAAPSVFIFP 120 PSDEQLKSGT ASVVCLLNNF YPREAKVQWK VDNALQSGNS QESVTEQDSK DSTYSLSSTL 180 TLSKADYEKH KVYACEVTHQ GLSSPVTKSF NRGEC 215
SEQ ID NO:210 вариабельная тяжелая цепь ипилимумаба	QVQLVESGGG VVQPGRSLRL SCAASGFTFS SYTMHWVRQA PGKGLEWVTF ISYDGNNKYY 60 ADSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAIYYCARTG WLGPFDYWGQ GTLVTVSS 118
SEQ ID NO:211 вариабельная легкая цепь ипилимумаба	EIVLTQSPGT LSLSPGERAT LSCRASQSVG SSYLAWYQQK PGQAPRLLIY GAFSRATGIP 60 DRFSGSGSGT DFTLTISRLE PEDFAVYYCQ QYGSSPWTFG QGTKVEIK 108
SEQ ID NO:212 CDR1 тяжелой цепи ипилимумаба	GFTFSSYT 8
SEQ ID NO:213 CDR2 тяжелой цепи ипилимумаба	TFISYDGNNK 10
SEQ ID NO:214 CDR3 тяжелой цепи ипилимумаба	ARTGWLGPFD Y 11
SEQ ID NO:215 CDR1 легкой цепи ипилимумаба	QSVGSSY 7
SEQ ID NO:216 CDR2 легкой цепи ипилимумаба	GAF 3
SEQ ID NO:217 CDR3 легкой цепи ипилимумаба	QQYGSSPWT 9

В некоторых вариантах осуществления ингибитор CTLA-4 представляет собой ипилимумаб или его биоаналог, причем ипилимумаб вводят в дозе от около 0,5 мг/кг до около 10 мг/кг. В некоторых вариантах осуществления ингибитор CTLA-4 представляет собой ипилимумаб или его биоаналог, причем ипилимумаб вводят в дозе около 0,5 мг/кг, около 1 мг/кг, около 1,5 мг/кг, около 2 мг/кг, около 2,5 мг/кг, около 3 мг/кг, около 3,5 мг/кг, около 4 мг/кг, около 4,5 мг/кг, около 5 мг/кг, около 5,5 мг/кг, около 6 мг/кг,

около 6,5 мг/кг, около 7 мг/кг, около 7,5 мг/кг, около 8 мг/кг, около 8,5 мг/кг, около 9 мг/кг, около 9,5 мг/кг или около 10 мг/кг. В некоторых вариантах осуществления введение ипилимумаба начинают за 1, 2, 3, 4 или 5 недель до резекции (т.е. до получения образца опухоли у субъекта или пациента). В некоторых вариантах осуществления введение ипилимумаба начинают за 1, 2 или 3 недели до резекции (т.е. до получения образца опухоли у субъекта или пациента).

В некоторых вариантах осуществления ингибитор CTLA-4 представляет собой ипилимумаб или его биоаналог, причем ипилимумаб вводят в дозе от около 200 мг до около 500 мг. В некоторых вариантах осуществления ингибитор CTLA-4 представляет собой ипилимумаб или его биоаналог, причем ипилимумаб вводят в дозе около 200 мг, около 220 мг, около 240 мг, около 260 мг, около 280 мг, около 300 мг, около 320 мг, около 340 мг, около 360 мг, около 380 мг, около 400 мг, около 420 мг, около 440 мг, около 460 мг, около 480 мг или около 500 мг. В некоторых вариантах осуществления введение ипилимумаба начинают за 1, 2, 3, 4 или 5 недель до резекции (т.е. до получения образца опухоли у субъекта или пациента). В некоторых вариантах осуществления введение ипилимумаба начинают за 1, 2 или 3 недели до резекции (т.е. до получения образца опухоли у субъекта или пациента).

В некоторых вариантах осуществления ингибитор CTLA-4 представляет собой ипилимумаб или его биоаналог, причем ипилимумаб вводят каждые 2 недели, каждые 3 недели, каждые 4 недели, каждые 5 недель или каждые 6 недель. В некоторых вариантах осуществления введение ипилимумаба начинают за 1, 2, 3, 4 или 5 недель до резекции (т.е. до получения образца опухоли у субъекта или пациента). В некоторых вариантах осуществления введение ипилимумаба начинают за 1, 2 или 3 недели до резекции (т.е. до получения образца опухоли у субъекта или пациента).

В некоторых вариантах осуществления ипилимумаб вводят для лечения нерезектабельной или метастатической меланомы. В некоторых вариантах осуществления ипилимумаб вводят для лечения нерезектабельной или метастатической меланомы в дозе около мг/кг каждые 3 недели, максимум 4 дозы. В некоторых вариантах осуществления введение ипилимумаба начинают за 1, 2, 3, 4 или 5 недель до резекции (т.е. до получения образца опухоли у субъекта или пациента). В некоторых вариантах осуществления введение ипилимумаба начинают за 1, 2 или 3 недели до резекции (т.е. до получения образца опухоли у субъекта или пациента).

В некоторых вариантах осуществления ипилимумаб вводят для адъювантного лечения меланомы. В некоторых вариантах осуществления ипилимумаб вводят для адъювантного лечения меланомы в дозе около 10 мг/кг каждые 3 недели в виде 4 доз, а затем по 10 мг/кг каждые 12 недель на срок вплоть до 3 лет. В некоторых вариантах осуществления введение ипилимумаба начинают за 1, 2, 3, 4 или 5 недель до резекции (т.е. до получения образца опухоли у субъекта или пациента). В некоторых вариантах осуществления введение ипилимумаба начинают за 1, 2 или 3 недели до резекции (т.е. до получения образца опухоли у субъекта или пациента).

В некоторых вариантах осуществления ипилимумаб вводят для лечения распространенного почечно-клеточного рака. В некоторых вариантах осуществления ипилимумаб вводят для лечения распространенного почечно-клеточного рака в дозе около 1 мг/кг сразу после введения 3 мг/кг ниволумаба в тот же день, каждые 3 недели в виде 4 доз. В некоторых вариантах осуществления после введения 4 доз комбинации ниволумаб можно вводить в качестве единственного агента в соответствии со стандартными схемами дозирования для лечения распространенного почечно-клеточного рака и/или почечно-клеточного рака. В некоторых вариантах осуществления введение ипилимумаба начинают за 1, 2, 3, 4 или 5 недель до резекции (т.е. до получения образца опухоли у субъекта или пациента). В некоторых вариантах осуществления введение ипилимумаба начинают за 1, 2 или 3 недели до резекции (т.е. до получения образца опухоли у субъекта или пациента).

В некоторых вариантах осуществления ипилимумаб вводят для лечения метастатического колоректального рака с высокой микросателлитной нестабильностью (MSI-H) или дефицитом репарации несоответствия (dMMR). В некоторых вариантах осуществления ипилимумаб вводят для лечения метастатического колоректального рака с высокой микросателлитной нестабильностью (MSI-H) или дефицитом репарации несоответствия (dMMR) в дозе около 1 мг/кг внутривенно в течение 30 мин сразу после ниволумаба в дозе 3 мг/кг внутривенно в течение 30 мин в тот же день, каждые 3 недели в виде 4 доз. В некоторых вариантах осуществления после введения 4 доз комбинации ниволумаб вводят в качестве единственного агента, как это рекомендовано в соответствии со стандартными схемами дозирования для лечения метастатического колоректального рака с высокой микросателлитной нестабильностью (MSI-H) или дефектом репарации несоответствия (dMMR). В некоторых вариантах осуществления введение ипилимумаба начинают за 1, 2, 3, 4 или 5 недель до резекции (т.е. до получения образца опухоли у субъекта или пациента). В некоторых вариантах осуществления введение ипилимумаба начинают за 1, 2 или 3 недели до резекции (т.е. до получения образца опухоли у субъекта или пациента).

В некоторых вариантах осуществления ипилимумаб вводят для лечения гепатоцеллюлярной карциномы. В некоторых вариантах осуществления ипилимумаб вводят для лечения гепатоцеллюлярной карциномы в дозе около 3 мг/кг внутривенно в течение 30 мин сразу после введения ниволумаба в дозе 1 мг/кг внутривенно в течение 30 мин в тот же день, каждые 3 недели в виде 4 доз. В некоторых вариантах осуществления после введения 4 доз комбинации ниволумаб вводят в качестве единственного агента в

соответствии со стандартными схемами дозирования для лечения гепатоцеллюлярнаой карциномы. В некоторых вариантах осуществления введение ипилимумаба начинают за 1, 2, 3, 4 или 5 недель до резекции (т.е. до получения образца опухоли у субъекта или пациента). В некоторых вариантах осуществления введение ипилимумаба начинают за 1, 2 или 3 недели до резекции (т.е. до получения образца опухоли у субъекта или пациента).

В некоторых вариантах осуществления ипилимумаб вводят для лечения метастатического немелкоклеточного рака легкого. В некоторых вариантах осуществления ипилимумаб вводят для лечения метастатического немелкоклеточного рака легкого в дозе около 1 мг/кг каждые 6 недель с ниволумабом в дозе 3 мг/кг каждые 2 недели. В некоторых вариантах осуществления ипилимумаб вводят для лечения метастатического немелкоклеточного рака легкого в дозе около 1 мг/кг каждые 6 недель с ниволумабом в дозе 360 мг каждые 3 недели и 2 циклами химиотерапии на основе дублетов платины. В некоторых вариантах осуществления введение ипилимумаба начинают за 1, 2, 3, 4 или 5 недель до резекции (т.е. до получения образца опухоли у субъекта или пациента). В некоторых вариантах осуществления введение ипилимумаба начинают за 1, 2 или 3 недели до резекции (т.е. до получения образца опухоли у субъекта или пациента).

В некоторых вариантах осуществления ипилимумаб вводят для лечения злокачественной мезотелиомы плевры. В некоторых вариантах осуществления ипилимумаб вводят для лечения злокачественной мезотелиомы плевры в дозе около 1 мг/кг каждые 6 недель с ниволумабом в дозе 360 мг каждые 3 недели. В некоторых вариантах осуществления введение ипилимумаба начинают за 1, 2, 3, 4 или 5 недель до резекции (т.е. до получения образца опухоли у субъекта или пациента). В некоторых вариантах осуществления введение ипилимумаба начинают за 1, 2 или 3 недели до резекции (т.е. до получения образца опухоли у субъекта или пациента).

Тремелимумаб (также известный как CP-675206) представляет собой полностью человеческое моноклональное антитело IgG2 и имеет номер CAS 745013-59-6. Тремелимумаб описан как антитело 11.2.1 в патенте США № 6682736 (включенном в настоящий документ посредством ссылки). Аминокислотные последовательности тяжелой цепи и легкой цепи тремелимумаба представлены в SEQ ID NO: 218 и 219 соответственно. Тремелимумаб изучался в клинических испытаниях для лечения различных опухолей, включая меланому и рак молочной железы; в которых тремелимумаб вводили внутривенно в виде однократной или многократных доз каждые 4 или 12 недель в диапазоне доз от 0,01 до 15 мг/кг. В схемах, предусмотренных настоящим изобретением, тремелимумаб вводят местно, в частности внутрикожно или подкожно. Эффективное количество тремелимумаба, вводимого внутрикожно или подкожно, обычно находится в диапазоне 5-200 мг/доза на человека. В некоторых вариантах осуществления эффективное количество тремелимумаба находится в диапазоне 10-150 мг/доза на человека на дозу. В некоторых конкретных вариантах осуществления эффективное количество тремелимумаба составляет около 10, 25, 37,5, 40, 50, 75, 100, 125, 150, 175 или 200 мг/доза на человека.

В одном варианте осуществления ингибитор CTLA-4 содержит тяжелую цепь, представленную SEQ ID NO: 218, и легкую цепь, представленную SEQ ID NO: 219. В одном варианте осуществления ингибитор CTLA-4 содержит тяжелые и легкие цепи, имеющие последовательности, показанные в SEQ ID NO: 218 и SEQ ID NO: 219, соответственно, или антигенсвязывающие фрагменты, Fab-фрагменты, одноцепочечные вариабельные фрагменты (scFv), их варианты или конъюгаты. В одном варианте осуществления ингибитор CTLA-4 содержит тяжелую и легкую цепи, каждая из которых по меньшей мере на 99% идентична последовательностям, показанным в SEQ ID NO: 218 и SEQ ID NO: 219 соответственно. В одном варианте осуществления ингибитор CTLA-4 содержит тяжелую и легкую цепи, каждая из которых по меньшей мере на 98% идентична последовательностям, показанным в SEQ ID NO: 218 и SEQ ID NO: 219 соответственно. В одном варианте осуществления ингибитор CTLA-4 содержит тяжелую и легкую цепи, каждая из которых по меньшей мере на 97% идентична последовательностям, показанным в SEQ ID NO: 218 и SEQ ID NO: 219 соответственно. В одном варианте осуществления ингибитор CTLA-4 содержит тяжелую и легкую цепи, каждая из которых по меньшей мере на 96% идентична последовательностям, показанным в SEQ ID NO: 218 и SEQ ID NO: 219 соответственно. В одном варианте осуществления ингибитор CTLA-4 содержит тяжелую и легкую цепи, каждая из которых по меньшей мере на 95% идентична последовательностям, показанным в SEQ ID NO: 218 и SEQ ID NO: 219 соответственно.

В одном варианте осуществления ингибитор CTLA-4 содержит CDR тяжелой и легкой цепи или вариабельные области (VR) тремелимумаба. В одном варианте осуществления вариабельная область тяжелой цепи (V_H) ингибитора CTLA-4 содержит последовательность, показанную в SEQ ID NO: 220, а вариабельная область легкой цепи (V_L) ингибитора CTLA-4 содержит последовательность, показанную в SEQ ID NO: 221, или их консервативные аминокислотные замены. В одном варианте осуществления ингибитор CTLA-4 содержит области V_H и V_L, каждая из которых по меньшей мере на 99% идентична последовательностям, показанным в SEQ ID NO: 220 и SEQ ID NO: 221 соответственно. В одном варианте осуществления ингибитор CTLA-4 содержит области V_H и V_L, каждая из которых по меньшей мере на 98% идентична последовательностям, показанным в SEQ ID NO: 220 и SEQ ID NO: 221 соответственно. В одном варианте осуществления ингибитор CTLA-4 содержит области V_H и V_L, каждая из которых по меньшей мере на 97% идентична последовательностям, показанным в SEQ ID NO: 220 и SEQ ID NO: 221

соответственно. В одном варианте осуществления ингибитор CTLA-4 содержит области V_H и V_L, каждая из которых по меньшей мере на 96% идентична последовательностям, показанным в SEQ ID NO: 220 и SEQ ID NO: 221 соответственно. В одном варианте осуществления ингибитор CTLA-4 содержит области V_H и V_L, каждая из которых по меньшей мере на 95% идентична последовательностям, показанным в SEQ ID NO: 220 и SEQ ID NO: 221 соответственно.

В одном варианте осуществления ингибитор CTLA-4 содержит домены CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, имеющие последовательности, указанные в SEQ ID NO: 222, SEQ ID NO: 223 и SEQ ID NO: 224 соответственно или их консервативные аминокислотные замены, и домены CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, имеющие последовательности, представленные в SEQ ID NO: 225, SEQ ID NO: 226 и SEQ ID NO: 227 соответственно, или их консервативные аминокислотные замены. В одном варианте осуществления антитело конкурирует за связывание и/или связывается с тем же эпитопом на CTLA-4, что и любое из вышеупомянутых антител.

В одном варианте осуществления ингибитор CTLA-4 представляет собой биоподобное моноклональное антитело к CTLA-4, одобренное регулирующими органами по лекарственным средствам в отношении тремелимумаба. В одном варианте осуществления биоаналог содержит антитело к CTLA-4, содержащее аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 97% идентичность последовательности, например, 97%, 98%, 99% или 100% идентичность последовательности с аминокислотной последовательностью референтного лекарственного средства или референтного биологического продукта, который содержит одну или более посттрансляционных модификаций в сравнении с референтным лекарственным средством или референтным биологическим продуктом, причем референтное лекарственное средство или референтный биологический продукт представляет собой тремелимумаб. В некоторых вариантах осуществления одна или более посттрансляционных модификаций выбраны из одного или более из следующего: гликозилирование, окисление, дезамидирование и укорочение. Аминокислотные последовательности тремелимумаба представлены в табл. 24. В некоторых вариантах осуществления биоаналог представляет собой антитело к CTLA-4, разрешенное или поданное на регистрацию, причем антитело к CTLA-4 предоставлено в составе, который отличается от составов референтного лекарственного средства или референтного биологического продукта, причем референтное лекарственное средство или референтный биологический продукт представляет собой тремелимумаб. Антитело к CTLA-4 может быть разрешено регулирующим органом по лекарственным средствам, таким как FDA США и/или EMA Европейского Союза. В некоторых вариантах осуществления биоаналог представлен в виде композиции, которая дополнительно содержит одно или более вспомогательных веществ, причем одно или более вспомогательных веществ являются такими же или отличными от вспомогательных веществ, содержащихся в референтном лекарственном средстве или референтном биологическом продукте, причем референтное лекарственное средство или референтный биологический продукт представляет собой тремелимумаб. В некоторых вариантах осуществления биоаналог представлен в виде композиции, которая дополнительно содержит одно или более вспомогательных веществ, причем одно или более вспомогательных веществ являются такими же или отличными от вспомогательных веществ, содержащихся в референтном лекарственном средстве или референтном биологическом продукте, причем референтное лекарственное средство или референтный биологический продукт представляет собой тремелимумаб.

Таблица 24

Аминокислотные последовательности тремелимумаба

Идентификатор	Последовательность (однобуквенные символы аминокислот)
SEQ ID NO:218 тяжелая цепь тремелимумаба	QVQLVESGGG VVQPGRSLRL SCAASGFTFS SYGMHWVRQA PGKGLEWVAV IWYDGSNKYY 60 ADSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCARDP RGATLYYYYY GMDVWGQGTT 120 VTVSSASTKG PSVFPLAPCS RSTSESTAAL GCLVKDYFPE PVTVSWNSGA LTSGVHTFPA 180 VLQSSGLYSL SSVVTVPSSN FGTQTYTCNV DHKPSNTKVD KTVERKCCVE CPPCPAPPVA 240 GPSVFLFPPK PKDTLMISRT PEVTCVVVDV SHEDPEVQFN WYVDGVEVHN AKTKPREEQF 300 NSTFRVVSVL TVVHQDWLNG KEYKCKVSNK GLPAPIEKTI SKTKGQPREP QVYTLPPSRE 360 EMTKNQVSLT CLVKGFYPSD IAVEWESNGQ PENNYKTTPP MLDSDGSFFL YSKLTVDKSR 420 WQQGNVFSCS VMHEALHNHY TQKSLSLSPG K 451
SEQ ID NO:219 легкая цепь тремелимумаба	DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQSIN SYLDWYQQKP GKAPKLLIYA ASSLQSGVPS 60 RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ YYSTPFTFGP GTKVEIKRTV AAPSVFIFPP 120 SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQWKV DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYSLSSTLT 180 LSKADYEKHK VYACEVTHQG LSSPVTKSFN RGEC 214
SEQ ID NO:220 вариабельная тяжелая цепь тремелимумаба	GVVQPGRSLR LSCAASGFTF SSYGMHWVRQ APGKGLEWVA VIWYDGSNKY YADSVKGRFT 60 ISRDNSKNTL YLQMNSLRAE DTAVYYCARD PRGATLYYYY YGMDVWGQGT TVTVSSASTK 120 GPSVFPLAPC SRSTSESTAA LGCLVKDYFP EPVTVSWNSG ALTSGVH 167

SEQ ID NO:221 вариабельная легкая цепь тремелимумаба	PSSLSASVGD RVTITCRASQ SINSYLDWYQ QKPGKAPKLL IYAASSLQSG VPSRFSGSGS 60 GTDFTLTISS LQPEDFATYY CQQYYSTPFT FGPGTKVEIK RTVAAPSVFI FPPSDEQLKS 120 GTASVVCLLN NFYPREAKV 139
SEQ ID NO:222 CDR1 тяжелой цепи тремелимумаба	GFTFSSYGMH 10
SEQ ID NO:223 CDR2 тяжелой цепи тремелимумаба	VIWYDGSNKY YADSV 15
SEQ ID NO:224 CDR3 тяжелой цепи тремелимумаба	DPRGATLYYY YYGMDV 16
SEQ ID NO:225 CDR1 легкой цепи тремелимумаба	RASQSINSYL D 11
SEQ ID NO:226 CDR2 легкой цепи тремелимумаба	AASSLQS 7
SEQ ID NO:227 CDR3 легкой цепи тремелимумаба	QQYYSTPFT 9

В некоторых вариантах осуществления ингибитор CTLA-4 представляет собой тремелимумаб или его биоаналог, причем тремелимумаб вводят в дозе от около 0,5 мг/кг до около 10 мг/кг. В некоторых вариантах осуществления ингибитор CTLA-4 представляет собой тремелимумаб или его биоаналог, причем тремелимумаб вводят в дозе около 0,5 мг/кг, около 1 мг/кг, около 1,5 мг/кг, около 2 мг/кг, около 2,5 мг/кг, около 3 мг/кг, около 3,5 мг/кг, около 4 мг/кг, около 4,5 мг/кг, около 5 мг/кг, около 5,5 мг/кг, около 6 мг/кг, около 6,5 мг/кг, около 7 мг/кг, около 7,5 мг/кг, около 8 мг/кг, около 8,5 мг/кг, около 9 мг/кг, около 9,5 мг/кг или около 10 мг/кг. В некоторых вариантах осуществления введение тремелимумаба начинают за 1, 2, 3, 4 или 5 недель до резекции (т.е. до получения образца опухоли у субъекта или пациента). В некоторых вариантах осуществления введение тремелимумаба начинают за 1, 2 или 3 недели до резекции (т.е. до получения образца опухоли у субъекта или пациента).

В некоторых вариантах осуществления ингибитор CTLA-4 представляет собой тремелимумаб или его биоаналог, причем тремелимумаб вводят в дозе от около 200 мг до около 500 мг. В некоторых вариантах осуществления ингибитор CTLA-4 представляет собой ипилимумаб или его биоаналог, причем ипилимумаб вводят в дозе около 200 мг, около 220 мг, около 240 мг, около 260 мг, около 280 мг, около 300 мг, около 320 мг, около 340 мг, около 360 мг, около 380 мг, около 400 мг, около 420 мг, около 440 мг, около 460 мг, около 480 мг или около 500 мг. В некоторых вариантах осуществления введение тремелимумаба начинают за 1, 2, 3, 4 или 5 недель до резекции (т.е. до получения образца опухоли у субъекта или пациента). В некоторых вариантах осуществления введение тремелимумаба начинают за 1, 2 или 3 недели до резекции (т.е. до получения образца опухоли у субъекта или пациента).

В некоторых вариантах осуществления ингибитор CTLA-4 представляет собой тремелимумаб или его биоаналог, причем тремелимумаб вводят каждые 2 недели, каждые 3 недели, каждые 4 недели, каждые 5 недель или каждые 6 недель. В некоторых вариантах осуществления введение тремелимумаба на-

чинают за 1, 2, 3, 4 или 5 недель до резекции (т.е. до получения образца опухоли у субъекта или пациента). В некоторых вариантах осуществления введение тремелимумаба начинают за 1, 2 или 3 недели до резекции (т.е. до получения образца опухоли у субъекта или пациента).

В одном варианте осуществления ингибитор CTLA-4 представляет собой залифелимаб от Agenus или его биоаналоги, антигенсвязывающие фрагменты, конъюгаты или их варианты. Залифрелимаб представляет собой полностью человеческое моноклональное антитело. Залифрелимабу присвоен регистрационный номер Chemical Abstracts Service (CAS) 2148321-69-9, и он также известен как AGEN1884. Получение и свойства залифрелимаба описаны в патенте США № 10144779 и публикации заявки на патент США № US2020/0024350 A1, описание которых включено в настоящий документ посредством ссылки.

В одном варианте осуществления ингибитор CTLA-4 содержит тяжелую цепь, представленную SEQ ID NO: 228, и легкую цепь, представленную SEQ ID NO: 229. В одном варианте осуществления ингибитор CTLA-4 содержит тяжелые и легкие цепи, имеющие последовательности, показанные в SEQ ID NO: 228 и SEQ ID NO: 229, соответственно, или антигенсвязывающие фрагменты, Fab-фрагменты, одноцепочечные вариабельные фрагменты (scFv), их варианты или конъюгаты. В одном варианте осуществления ингибитор CTLA-4 содержит тяжелую и легкую цепи, каждая из которых по меньшей мере на 99% идентична последовательностям, показанным в SEQ ID NO: 228 и SEQ ID NO: 229 соответственно. В одном варианте осуществления ингибитор CTLA-4 содержит тяжелую и легкую цепи, каждая из которых по меньшей мере на 98% идентична последовательностям, показанным в SEQ ID NO: 228 и SEQ ID NO: 229 соответственно. В одном варианте осуществления ингибитор CTLA-4 содержит тяжелую и легкую цепи, каждая из которых по меньшей мере на 97% идентична последовательностям, показанным в SEQ ID NO: 228 и SEQ ID NO: 229 соответственно. В одном варианте осуществления ингибитор CTLA-4 содержит тяжелую и легкую цепи, каждая из которых по меньшей мере на 96% идентична последовательностям, показанным в SEQ ID NO: 228 и SEQ ID NO: 229 соответственно. В одном варианте осуществления ингибитор CTLA-4 содержит тяжелую и легкую цепи, каждая из которых по меньшей мере на 95% идентична последовательностям, показанным в SEQ ID NO: 228 и SEQ ID NO: 229 соответственно.

В одном варианте осуществления ингибитор CTLA-4 содержит CDR тяжелой и легкой цепи или вариабельные области (VR) залифрелимаба. В одном варианте осуществления вариабельная область тяжелой цепи (V_H) ингибитора CTLA-4 содержит последовательность, показанную в SEQ ID NO: 230, а вариабельная область легкой цепи (V_L) ингибитора CTLA-4 содержит последовательность, показанную в SEQ ID NO: 231, или их консервативные аминокислотные замены. В одном варианте осуществления ингибитор CTLA-4 содержит области V_H и V_L, каждая из которых по меньшей мере на 99% идентична последовательностям, показанным в SEQ ID NO: 230 и SEQ ID NO: 231 соответственно. В одном варианте осуществления ингибитор CTLA-4 содержит области V_H и V_L, каждая из которых по меньшей мере на 98% идентична последовательностям, показанным в SEQ ID NO: 230 и SEQ ID NO: 231 соответственно. В одном варианте осуществления ингибитор CTLA-4 содержит области V_H и V_L, каждая из которых по меньшей мере на 97% идентична последовательностям, показанным в SEQ ID NO: 230 и SEQ ID NO: 231 соответственно. В одном варианте осуществления ингибитор CTLA-4 содержит области V_H и V_L, каждая из которых по меньшей мере на 96% идентична последовательностям, показанным в SEQ ID NO: 230 и SEQ ID NO: 231 соответственно. В одном варианте осуществления ингибитор CTLA-4 содержит области V_H и V_L, каждая из которых по меньшей мере на 95% идентична последовательностям, показанным в SEQ ID NO: 230 и SEQ ID NO: 231 соответственно.

В одном варианте осуществления ингибитор CTLA-4 содержит домены CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, имеющие последовательности, указанные в SEQ ID NO: 231, SEQ ID NO: 233 и SEQ ID NO: 234 соответственно или их консервативные аминокислотные замены, и домены CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, имеющие последовательности, представленные в SEQ ID NO: 235, SEQ ID NO: 236 и SEQ ID NO: 237 соответственно, или их консервативные аминокислотные замены. В одном варианте осуществления антитело конкурирует за связывание и/или связывается с тем же эпитопом на CTLA-4, что и любое из вышеупомянутых антител.

В одном варианте осуществления ингибитор CTLA-4 представляет собой биоподобное моноклональное антитело CTLA-4, одобренное регулирующими органами по лекарственным средствам в отношении залифрелимаба. В одном варианте осуществления биоаналог содержит антитело к CTLA-4, содержащее аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 97% идентичность последовательности, например, 97%, 98%, 99% или 100% идентичность последовательности с аминокислотной последовательностью референтного лекарственного средства или референтного биологического продукта, который содержит одну или более посттрансляционных модификаций в сравнении с референтным лекарственным средством или референтным биологическим продуктом, причем референтное лекарственное средство или референтный биологический продукт представляет собой залифрелимаб. В некоторых вариантах осуществления одна или более посттрансляционных модификаций выбраны из одного или более из следующего: гликозилирование, окисление, дезамидирование и укорочение. Аминокислотные последовательности залифрелимаба представлены в табл. 25. В некоторых вариантах осуществления биоаналог представляет собой антитело к CTLA-4, разрешенное или поданное на регистрацию, причем антитело к CTLA-4 предоставлено в составе, который отличается от составов референтного ле-

карственного средства или референтного биологического продукта, причем референтное лекарственное средство или референтный биологический продукт представляет собой залифрелимаб. Антитело к CTLA-4 может быть разрешено регулирующим органом по лекарственным средствам, таким как FDA США и/или EMA Европейского Союза. В некоторых вариантах осуществления биоаналог представлен в виде композиции, которая дополнительно содержит одно или более вспомогательных веществ, причем одно или более вспомогательных веществ являются такими же или отличными от вспомогательных веществ, содержащихся в референтном лекарственном средстве или референтном биологическом продукте, причем референтное лекарственное средство или референтный биологический продукт представляет собой залифрелимаб. В некоторых вариантах осуществления биоаналог представлен в виде композиции, которая дополнительно содержит одно или более вспомогательных веществ, причем одно или более вспомогательных веществ являются такими же или отличными от вспомогательных веществ, содержащихся в референтном лекарственном средстве или референтном биологическом продукте, причем референтное лекарственное средство или референтный биологический продукт представляет собой залифрелимаб.

Таблица 25

Аминокислотные последовательности залифрелимаба

Идентификатор	Последовательность (однобуквенные символы аминокислот)
SEQ ID NO:228 тяжелая цепь залифрелимаба	EVQLVESGGG LVKPGGSLRL SCAASGFTFS SYSMNWVRQA PGKGLEWVSS ISSSSSYIYY 60 ADSVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TAVYYCARVG LMGPFDIWGQ GTMVTVSSAS 120 TKGPSVFPLA PSSKSTSGGT AALGCLVKDY FPEPVTVSWN SGALTSGVHT FPAVLQSSGL 180 YSLSSVVTVP SSSLGTQTYI CNVNHKPSNT KVDKRVEPKS CDKTHTCPPC PAPELLGGPS 240 VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST 300 YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP APIEKTISKA KGQPREPQVY TLPPSREEMT 360 KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTPPVLD SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ 420 GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPGK 448
SEQ ID NO:229 легкая цепь залифрелимаба	EIVLTQSPGT LSLSPGERAT LSCRASQSVS RYLGWYQQKP GQAPRLLIYG ASTRATGIPD 60 RFSGSGSGTD FTLTITRLEP EDFAVYYCQQ YGSSPWTFGQ GTKVEIKRTV AAPSVFIFPP 120 SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQWKV DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYSLSSTLT 180 LSKADYEKHK VYACEVTHQG LSSPVTKSFN RGEC 214
SEQ ID NO:230 вариабельная тяжелая цепь залифрелимаба	EVQLVESGGG LVKPGGSLRL SCAASGFTFS SYSMNWVRQA PGKGLEWVSS ISSSSSYIYY 60 ADSVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TAVYYCARVG LMGPFDIWGQ GTMVTVSS 118
SEQ ID NO:231 вариабельная легкая цепь залифрелимаба	EIVLTQSPGT LSLSPGERAT LSCRASQSVS RYLGWYQQKP GQAPRLLIYG ASTRATGIPD 60 RFSGSGSGTD FTLTITRLEP EDFAVYYCQQ YGSSPWTFGQ GTKVEIK 107
SEQ ID NO:232 CDR1 тяжелой цепи	GFTFSSYS 8

залифрелимаба	
SEQ ID NO:233 CDR2 тяжелой цепи залифрелимаба	ISSSSSYI 8
SEQ ID NO:234 CDR3 тяжелой цепи залифрелимаба	ARVGLMGPFD I 11
SEQ ID NO:235 CDR1 легкой цепи залифрелимаба	QSVSRY 6
SEQ ID NO:236 CDR2 легкой цепи залифрелимаба	GAS 3
SEQ ID NO:237 CDR3 легкой цепи залифрелимаба	QOYGSSPWT 9

Примеры дополнительных антител к CTLA-4 включают, помимо прочего: AGEN1181, BMS-986218, BCD-145, ONC-392, CS1002, REGN4659 и ADG116, которые известны специалистам в данной области.

В некоторых вариантах осуществления антитело к CTLA-4 представляет собой антитело к CTLA-4, описанное в любой из следующих патентных публикаций: US 2019/0048096 A1; US 2020/0223907; US 2019/0201334; US 2019/0201334; US 2005/0201994; EP 1212422 B1; WO 2018/204760; WO 2018/204760; WO 2001/014424; WO 2004/035607; WO 2003/086459; WO 2012/120125; WO 2000/037504; WO 2009/100140; WO 2006/09649; WO2005092380; WO 2007/123737; WO 2006/029219; WO 2010/0979597; WO 2006/12168 и WO 1997020574, каждая из которых включена в настоящий документ посредством ссылки. Дополнительные антитела к CTLA-4 описаны в патентах США №№ 5811097, 5855887, 6051227 и 6984720; в публикациях PCT №№ WO 01/14424 и WO 00/37504; и в публикациях США №№ 2002/0039581 и 2002/086014; и/или патентах США №№ 5977318, 6682736, 7109003 и 7132281, каждый из которых включен в настоящий документ посредством ссылки. В некоторых вариантах осуществления антитело к CTLA-4 представляет собой, например, антитела, описанные в следующих публикациях: WO 98/42752; патенты США №№ 6682736 и 6207156; Hurwitz, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1998, 95, 10067-10071 (1998); Camacho, et al., J. Clin. Oncol, 2004, 22, 145 (Abstract No. 2505 (2004) (антитело CP-675206); или Mokyr, et al., Cancer Res., 1998, 58, 5301-5304 (1998), каждая из которых включена в настоящий документ посредством ссылки.

В некоторых вариантах осуществления ингибитор CTLA-4 представляет собой лиганд CTLA-4, как описано в публикации WO 1996/040915 (включенной в настоящий документ посредством ссылки).

В некоторых вариантах осуществления ингибитор CTLA-4 представляет собой ингибитор нуклеиновой кислоты экспрессии CTLA-4. Например, молекулы РНКи к CTLA-4 могут иметь форму молекул, описанных в публикациях PCT №№ WO 1999/032619 и WO 2001/029058; публикации США №№ 2003/0051263, 2003/0055020, 2003/0056235, 2004/265839, 2005/0100913, 2006/0024798, 2008/0050342, 2008/0081373, 2008/0248576 и 2008/055443; и/или патентах США №№ 6506559, 7282564, 7538095 и 7560438 (включенных в настоящий документ посредством ссылки). В некоторых случаях молекулы РНКи к CTLA-4 принимают форму двухцепочечных молекул РНКи, описанных в Европейском патенте № EP 1309726 (включенном в настоящий документ посредством ссылки). В некоторых случаях молекулы РНКи к CTLA-4 принимают форму двухцепочечных молекул РНКи, описанных в патентах США №№ 7056704 и 7078196 (включенных в настоящий документ посредством ссылки). В некоторых вариантах осуществления ингибитор CTLA-4 представляет собой аптамер, описанный в публикации международной патентной заявки № WO 2004/081021 (включенной в настоящий документ посредством ссылки).

В других вариантах осуществления молекулы РНКи к CTLA-4 по настоящему изобретению представляют собой молекулы РНК, описанные в патентах США №№ 5898031, 6107094, 7432249 и 7432250 и

в европейской заявке № EP 0928290 (включенной в настоящий документ посредством ссылки).

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение включает способ лечения пациента, страдающего от рака, включающий этапы применения схемы TIL, причем схема TIL включает продукт TIL, генетически модифицированный для экспрессии CCR, и дополнительно включающий этап введения ингибитора CTLA-4. В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение включает композицию, содержащую: (i) продукт TIL, генетически модифицированный для экспрессии CCR, и (ii) ингибитор CTLA-4. В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение включает набор, содержащий: (i) продукт TIL, генетически модифицированный для экспрессии CCR, и (ii) ингибитор CTLA-4.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение включает способ лечения пациента, страдающего от рака, включающий этапы применения схемы TIL, причем схема TIL включает продукт TIL, генетически модифицированный для экспрессии CCR, и дополнительно включающий этапы введения ингибитора CTLA-4 и либо ингибитора PD-1, либо ингибитора PD-L1. В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение включает композицию, содержащую: (i) продукт TIL, генетически модифицированный для экспрессии CCR, (ii) ингибитор CTLA-4 и (iii) либо ингибитор PD-1, либо ингибитор PD-L1. В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение включает набор, содержащий: (i) продукт TIL, генетически модифицированный для экспрессии CCR, (ii) ингибитор CTLA-4 и (iii) либо ингибитор PD-1, либо ингибитор PD-L1.

4. Предварительное кондиционирование пациентов лимфоделпецией.

В одном варианте осуществления изобретение относится к способу лечения рака с помощью популяции TIL, в котором пациента предварительно лечат немиелоаблативной химиотерапией до инфузии TIL в соответствии с настоящим изобретением. В одном варианте осуществления изобретение включает популяцию TIL для применения при лечении рака у пациента, который предварительно подвергался немиелоаблативной химиотерапии. В одном варианте осуществления популяция TIL предназначена для введения путем инфузии. В одном варианте осуществления немиелоаблативной химиотерапией является циклофосфамид в дозе 60 мг/кг/сутки в течение 2 дней (дни 27 и 26 до инфузии TIL) и флударабин в дозе 25 мг/м^2/сутки в течение 5 дней (дни с 27 по 23 до инфузии TIL). В одном варианте осуществления после немиелоаблативной химиотерапии и инфузии TIL (в день 0) в соответствии с настоящим изобретением пациент получает внутривенную инфузию IL-2 (альдеслейкин, коммерчески доступный как PROLEUKIN) внутривенно в дозе 720000 МЕ/кг каждые 8 ч до физиологической переносимости. В некоторых вариантах осуществления популяция TIL предназначена для лечения рака в комбинации с IL-2, причем IL-2 вводят после популяции TIL.

Экспериментальные данные показывают, что лимфодеплеция до адоптивного переноса опухолеспецифических Т-лимфоцитов играет ключевую роль в повышении эффективности лечения за счет устранения регуляторных Т-клеток и конкурирующих элементов иммунной системы ("цитокиновые осадки"). Соответственно, в некоторых вариантах осуществления изобретения до введения TIL по настоящему изобретению в отношении пациента применяют стадию лимфодеплеции (иногда также называемую "иммуносупрессивным кондиционированием").

Как правило, лимфодеплеция достигается введением флударабина или циклофосфамида (активная форма называется мафосфамидом) и их комбинаций. Такие способы описаны в публикациях Gassner, et al., Cancer Immunol. Immunother. 2011, 60, 75-85, Muranski, et al., Nat. Clin. Pract. Oncol., 2006, 3, 668-681, Dudley, et al., J. Clin. Oncol. 2008, 26, 5233-5239, and Dudley, et al., J. Clin. Oncol. 2005, 23, 2346-2357, все из которых полностью включены в настоящий документ посредством ссылки.

В некоторых вариантах осуществления флударабин вводят в концентрации от 0,5 мкг/мл до 10 мкг/мл флударабина. В некоторых вариантах осуществления флударабин вводят в концентрации 1 мкг/мл флударабина. В некоторых вариантах осуществления лечение флударабином проводят в течение 1 дня, 2 дней, 3 дней, 4 дней, 5 дней, 6 дней или 7 дней, или более. В некоторых вариантах осуществления флударабин вводят в дозе 10 мг/кг/сутки, 15 мг/кг/сутки, 20 мг/кг/сутки, 25 мг/кг/сутки, 30 мг/кг/сутки, 35 мг/кг/сутки, 40 мг/кг/сутки или 45 мг/кг/сутки. В некоторых вариантах осуществления лечение флударабином проводят в течение 2-7 дней в дозе 35 мг/кг/сутки. В некоторых вариантах осуществления лечение флударабином проводят в течение 4-5 дней в дозе 35 мг/кг/сутки. В некоторых вариантах осуществления лечение флударабином проводят в течение 4-5 дней в дозе 25 мг/кг/сутки.

В некоторых вариантах осуществления маффосфамид, активную форму циклофосфамида, получают в концентрации от 0,5 мкг/мл до 10 мкг/мл путем введения циклофосфамида. В некоторых вариантах осуществления маффосфамид, активную форму циклофосфамида, получают в концентрации 1 мкг/мл путем введения циклофосфамида. В некоторых вариантах осуществления лечение циклофосфамидом проводят в течение 1 дня, 2 дней, 3 дней, 4 дней, 5 дней, 6 дней или 7 дней, или более. В некоторых вариантах осуществления циклофосфамид вводят в дозе 100 мг/м^2/сутки, 150 мг/м^2/сутки, 175 мг/м^2/сутки, 200 мг/м^2/сутки, 225 мг/м^2/сутки, 250 мг/м^2/сутки, 275 мг/м^2/сутки или 300 мг/м^2/сутки. В некоторых вариантах осуществления циклофосфамид вводят внутривенно (т.е. в/в). В некоторых вариантах осуществления лечение циклофосфамидом проводят в течение 2-7 дней в дозе 35 мг/кг/сутки. В некоторых вариантах осуществления лечение циклофосфамид проводят в течение 4-5 дней в дозе 250 мг/м^2/сутки в/в. В некоторых вариантах осуществления лечение циклофосфамидом проводят в течение 4 дней в дозе 250 мг/м^2/сутки в/в.

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

В одном варианте осуществления лимфодеплецию проводят путем введения циклофосфамида в дозе 60 мг/м^2/сутки в течение двух дней с последующим введением флударабина в дозе 25 мг/м^2/сутки в течение пяти дней.

В одном варианте осуществления лимфодеплецию проводят путем введения циклофосфамида в дозе 60 мг/м^2/сутки в течение двух дней и введения флударабина в дозе 25 мг/м^2/сутки в течение пяти дней, при этом вводят как циклофосфамид, так и флударабин в первые двое суток, при этом лимфодеплецию проводят всего за пять суток.

В одном варианте осуществления лимфодеплецию проводят путем введения циклофосфамида в дозе около 50 мг/м^2/сутки в течение двух дней и введения флударабина в дозе около 25 мг/м^2/сутки в течение пяти дней, при этом вводят как циклофосфамид, так и флударабин в первые двое суток, при этом лимфодеплецию проводят всего за пять суток.

В одном варианте осуществления лимфодеплецию проводят путем введения циклофосфамида в дозе около 50 мг/м^2/сутки в течение двух дней и введения флударабина в дозе около 20 мг/м^2/сутки в течение пяти дней, при этом вводят как циклофосфамид, так и флударабин в первые двое суток, при этом лимфодеплецию проводят всего за пять суток.

В одном варианте осуществления лимфодеплецию проводят путем введения циклофосфамида в дозе около 40 мг/м^2/сутки в течение двух дней и введения флударабина в дозе около 20 мг/м^2/сутки в течение пяти дней, при этом вводят как циклофосфамид, так и флударабин в первые двое суток, при этом лимфодеплецию проводят всего за пять суток.

В одном варианте осуществления лимфодеплецию проводят путем введения циклофосфамида в дозе около 40 мг/м^2/сутки в течение двух дней и введения флударабина в дозе около 15 мг/м^2/сутки в течение пяти дней, при этом вводят как циклофосфамид, так и флударабин в первые двое суток, при этом лимфодеплецию проводят всего за пять суток.

В одном варианте осуществления лимфодеплецию проводят путем введения циклофосфамида в дозе 60 мг/м^2/сутки и флударабина в дозе 25 мг/м^2/сутки в течение двух дней с последующим введением флударабина в дозе 25 мг/м^2/сутки в течение трех дней.

В одном варианте осуществления циклофосфамид вводят с месной. В одном варианте осуществления месну вводят в дозе 15 мг/кг. В варианте осуществления, в котором выполняют инфузию месны, и при непрерывной инфузии, месну можно вводить в течение приблизительно 2 ч с циклофосфамидом (в дни -5 и/или -4), а затем со скоростью 3 мг/кг/час в течение оставшихся 22 ч в течение 24 ч, начиная одновременно с каждой дозой циклофосфамида.

В одном варианте осуществления лимфодеплеция включает этап лечения пациента по схеме IL-2, начиная со дня после введения пациенту третьей популяции TIL.

В одном варианте осуществления лимфодеплеция включает этап лечения пациента по схеме IL-2, начиная с того же дня, когда пациенту вводят третью популяцию TIL.

В некоторых вариантах осуществления лимфодеплеция включает 5 дней предварительного кондиционирования. В некоторых вариантах осуществления дни указаны как дни от -5 до -1 или от дня 0 до дня 4. В некоторых вариантах осуществления схема включает циклофосфамид в дни -5 и -4 (т.е. дни 0 и 1). В некоторых вариантах осуществления схема включает внутривенное введение циклофосфамида в дни -5 и -4 (т.е. в дни 0 и 1). В некоторых вариантах осуществления схема включает внутривенное введение циклофосфамида в дозе 60 мг/кг в дни -5 и -4 (т.е. в дни 0 и 1). В некоторых вариантах осуществления циклофосфамид вводят с месной. В некоторых вариантах осуществления схема дополнительно включает флударабин. В некоторых вариантах осуществления схема дополнительно включает внутривенное введение флударабина. В некоторых вариантах осуществления схема дополнительно включает внутривенное введение флударабина в дозе 25 мг/м^2. В некоторых вариантах осуществления схема дополнительно включает внутривенное введение флударабина в дозе 25 мг/м^2 в дни -5 и -1 (т.е. дни с 0 по 4). В некоторых вариантах осуществления схема дополнительно включает внутривенное введение флударабина в дозе 25 мг/м^2 в дни -5 и -1 (т.е. дни с 0 по 4).

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

В некоторых вариантах осуществления схема немиелоаблативной лимфодеплеции включает этапы введения циклофосфамида в дозе 60 мг/м^2/сутки и флударабина в дозе 25 мг/м^2/сутки в течение двух дней с последующим введением флударабина в дозе 25 мг/м^2/сутки в течение трех дней.

В некоторых вариантах осуществления режим немиелоаблативной лимфодеплеции применяют в соответствии с табл. 26.

Таблица 26

Иллюстративная схема лимфодеплеции и лечения

День	**-5**	**-4**	**-3**	**-2**	**-1**	**0**	**1**	**2**	**3**	**4**
Циклофосфамид 60 мг/кг	X	X								
Месна (при необходимости)	X	X								
Флударабин 25 мг/м^2/сутки	X	X	X	X	X					
Инфузия TIL						X				

В некоторых вариантах осуществления режим немиелоаблативной лимфодеплеции применяют в соответствии с табл. 27.

Таблица 27

Иллюстративная схема лимфодеплеции и лечения

День	**-4**	**-3**	**-2**	**-1**	**0**	**1**	**2**	**3**	**4**
Циклофосфамид 60 мг/кг	X	X							
Месна (при необходимости)	X	X							
Флударабин 25 мг/м^2/сутки	X	X	X	X					
Инфузия TIL					X				

В некоторых вариантах осуществления режим немиелоаблативной лимфодеплеции применяют в соответствии с табл. 28.

Таблица 28

Иллюстративная схема лимфодеплеции и лечения

День	**-3**	**-2**	**-1**	**0**	**1**	**2**	**3**	**4**
Циклофосфамид 60 мг/кг	X	X						
Месна (при необходимости)	X	X						
Флударабин 25 мг/м^2/сутки	X	X	X					
Инфузия TIL				X				

В некоторых вариантах осуществления режим немиелоаблативной лимфодеплеции применяют в соответствии с табл. 29.

Таблица 29

Иллюстративная схема лимфодеплеции и лечения

День	**-5**	**-4**	**-3**	**-2**	**-1**	**0**	**1**	**2**	**3**	**4**
Циклофосфамид 60 мг/кг	X	X								
Месна (при необходимости)	X	X								
Флударабин 25 мг/м^2/сутки			X	X	X					
День	**-5**	**-4**	**-3**	**-2**	**-1**	**0**	**1**	**2**	**3**	**4**
Инфузия TIL						X				

В некоторых вариантах осуществления режим немиелоаблативной лимфодеплеции применяют в соответствии с табл. 30.

Таблица 30

Иллюстративная схема лимфодеплеции и лечения

День	**-5**	**-4**	**-3**	**-2**	**-1**	**0**	**1**	**2**	**3**	**4**
Циклофосфамид 300 мг/кг	X	X								
Месна (при необходимости)	X	X								
Флударабин 30 мг/м^2/сутки	X	X	X	X	X					
Инфузия TIL						X				

В некоторых вариантах осуществления режим немиелоаблативной лимфодеплеции применяют в соответствии с табл. 31.

Таблица 31

Иллюстративная схема лимфодеплеции и лечения

День	**-4**	**-3**	**-2**	**-1**	**0**	**1**	**2**	**3**	**4**
Циклофосфамид 300 мг/кг	X	X							
Месна (при необходимости)	X	X							
Флударабин 30 мг/м^2/сутки	X	X	X	X					
Инфузия TIL					X				

В некоторых вариантах осуществления режим немиелоаблативной лимфодеплеции применяют в соответствии с табл. 32.

Таблица 32

Иллюстративная схема лимфодеплеции и лечения

День	**-3**	**-2**	**-1**	**0**	**1**	**2**	**3**	**4**
Циклофосфамид 300 мг/кг	X	X						
Месна (при необходимости)	X	X						
Флударабин 30 мг/м^2/сутки	X	X	X					
Инфузия TIL				X				

В некоторых вариантах осуществления режим немиелоаблативной лимфодеплеции применяют в соответствии с табл. 33.

Таблица 33

Иллюстративная схема лимфодеплеции и лечения

День	**-5**	**-4**	**-3**	**-2**	**-1**	**0**	**1**	**2**	**3**	**4**
Циклофосфамид 300 мг/кг	X	X								
Месна (при необходимости)	X	X								
День	**-5**	**-4**	**-3**	**-2**	**-1**	**0**	**1**	**2**	**3**	**4**
Флударабин 30 мг/м^2/сутки			X	X	X					
Инфузия TIL						X				

В некоторых вариантах осуществления инфузия TIL, применяемая с вышеуказанными вариантами осуществления схем миелоаблативной лимфодеплеции, может представлять собой любую композицию TIL, описанную в настоящем документе, включая продукты TIL, генетически модифицированные для экспрессии CCR, как описано в настоящем документе, и может также включать инфузии MIL и PBL вместо инфузии TIL, а также добавление схем IL-2 и введение сопутствующих препаратов (например, ингибиторов PD-1 и PD-L1), как описано в настоящем документе.

5. Схемы IL-2.

В одном варианте осуществления схема IL-2 включает схему с высокими дозами IL-2, при этом схема с высокими дозами IL-2 включает альдеслейкин или его биоаналог или вариант, вводимый внутривенно, начиная со дня после введения терапевтически эффективной части терапевтической популяции TIL, причем альдеслейкин или его биоаналог или вариант вводят в дозе 0,037 мг/кг или 0,044 мг/кг МЕ/кг (масса тела пациента) с помощью 15-минутных болюсных внутривенных инфузий каждые восемь часов до переносимости, в виде максимум 14 доз. После 9 дней отдыха это расписание может быть повторено еще в виде 14 доз, всего максимум 28 доз. В некоторых вариантах осуществления IL-2 вводят в виде 1, 2, 3, 4, 5 или 6 доз. В некоторых вариантах осуществления IL-2 вводят в максимальной дозе вплоть до 6 доз.

В одном варианте осуществления схема IL-2 включает схему IL-2 с декрещендо. Схемы IL-2 с декрещендо описаны в публикациях O'Day, et al., J. Clin. Oncol. 1999, 17, 2752-61 и Eton, et al., Cancer 2000, 88, 1703-9, описание которых включено в настоящий документ посредством ссылки. В одном варианте осуществления схема IL-2 с декрещендо включает введение внутривенно 18×10^6 МЕ/м^2 альдеслейкина или его биоаналога или варианта в течение 6 ч, с последующим введением внутривенно 18×10^6 МЕ/м^2 в течение 12 ч, с последующим введением внутривенно 18×10^6 МЕ/м^2 в течение 24 ч, с последующим введением внутривенно $4{,}5\times10^6$ МЕ/м^2 в течение 72 ч. Этот цикл лечения можно повторять каждые 28 дней, максимум четыре цикла. В одном варианте осуществления схема IL-2 с декрещендо включает 18000000 МЕ/м^2 в день 1, 9000000 МЕ/м^2 в день 2 и 4500000 МЕ/м^2 в дни 3 и 4.

В одном варианте осуществления схема IL-2 включает схему с низкими дозами IL-2. Можно применять любую схему с низкими дозами IL-2, известную в данной области техники, включая схемы с низкими дозами IL-2, описанные в публикациях Dominguez-Villar and Hafler, Nat. Immunology 2000, 19, 665-673; Hartemann, et al., Lancet Diabetes Endocrinol. 2013, 1, 295-305; и Rosenzwaig, et al., Ann. Rheum. Dis. 2019, 78, 209-217, описание которых включено в настоящий документ посредством ссылки. В одном варианте осуществления схема с низкими дозами IL-2 включает 18×10^6 МЕ на м^2 альдеслейкина или его биоаналога или варианта в течение 24 ч, вводимого в виде непрерывной инфузии в течение 5 дней, с последующими 2-6 днями без терапии IL-2, необязательно с последующими дополнительными 5 днями внутривенного введения альдеслейкина или его биоаналога или варианта в виде непрерывной инфузии 18×10^6 МЕ на м^2 в течение 24 ч, необязательно с последующими 3 неделями без терапии IL-2, после чего можно проводить дополнительные циклы.

В одном варианте осуществления схема IL-2 включает введение пегилированного IL-2 каждые 1, 2, 4, 6, 7, 14 или 21 день в дозе от 0,10 мг/сутки до 50 мг/сутки. В одном варианте осуществления схема IL-2 включает введение бемпегальдеслейкина или его фрагмента, варианта или биоаналога каждые 1, 2, 4, 6, 7, 14 или 21 день в дозе от 0,10 мг/сутки до 50 мг/сутки.

В одном варианте осуществления схема IL-2 включает введение THOR-707 или его фрагмента, варианта или биоаналога каждые 1, 2, 4, 6, 7, 14 или 21 день в дозе 0,10 мг/сутки до 50 мг/сутки.

В одном варианте осуществления схема IL-2 включает введение немвалейкина альфа или его фрагмента, варианта или биоаналога каждые 1, 2, 4, 6, 7, 14 или 21 день в дозе от 0,10 мг/сутки до 50 мг/сутки.

В одном варианте осуществления схема IL-2 включает введение фрагмента IL-2, привитого к каркасу антитела. В одном варианте осуществления схема IL-2 включает введение белка с привитым антителом-цитокином, который связывается с низкоаффинным рецептором IL-2. В одном варианте осуществления белок с привитым антителом-цитокином содержит вариабельную область тяжелой цепи (V_H), включающую определяющие комплементарность области HCDR1, HCDR2, HCDR3; вариабельную область легкой цепи (V_L), включающую LCDR1, LCDR2, LCDR3; и молекулу IL-2 или ее фрагмент, привитый в CDR V_H или V_L, причем белок с привитым антителом-цитокином предпочтительно размножает эффекторные Т-клетки в сравнении с регуляторными Т-клетками. В одном варианте осуществления белок с привитым антителом-цитокином содержит вариабельную область тяжелой цепи (V_H), включающую определяющие комплементарность области HCDR1, HCDR2, HCDR3; вариабельную область легкой цепи (V_L), включающую LCDR1, LCDR2, LCDR3; и молекулу IL-2 или ее фрагмент, привитый в CDR V_H или V_L, причем молекула IL-2 представляет собой мутеин, и причем белок с привитым антителом-цитокином предпочтительно размножает эффекторные Т-клетки в сравнении с регуляторными Т-клетками. В одном варианте осуществления схема IL-2 включает введение антитела, содержащего тяжелую цепь, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 29 и SEQ ID NO: 38, и легкую цепь, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 37 и SEQ ID NO: 39, или его фрагмента, варианта или биоаналога, каждые 1, 2, 4, 6, 7, 14 или 21 день в дозе от 0,10 мг/сутки до 50 мг/сутки.

В некоторых вариантах осуществления белок с привитым антителом-цитокином, описанный в настоящем документе, имеет более длительный период полужизни в сыворотке, чем молекула IL-2 дикого типа, такая как, помимо прочего, альдеслейкин (Proleukin®) или сравнимая молекула.

В некоторых вариантах осуществления инфузия TIL, применяемая с вышеуказанными вариантами осуществления схем миелоаблативной лимфодеплеции, может представлять собой любую композицию

TIL, описанную в настоящем документе, и может также включать инфузии MIL и PBL вместо инфузии TIL, а также добавление схем IL-2 и введение сопутствующих препаратов (например, ингибиторов PD-1 и PD-L1), как описано в настоящем документе.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение включает способ лечения пациента, страдающего от рака, включающий этап применения схемы TIL, причем схема TIL включает продукт TIL, генетически модифицированный для экспрессии CCR, и дополнительно включающий этап применения схемы IL-2. В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение включает композицию, содержащую: (i) продукт TIL, генетически модифицированный для экспрессии CCR, и (ii) схему IL-2. В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение включает набор, содержащий: (i) продукт TIL, генетически модифицированный для экспрессии CCR, и (ii) схему IL-2.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение включает способ лечения пациента, страдающего от рака, включающий этапы применения схемы TIL, причем схема TIL включает продукт TIL, генетически модифицированный для экспрессии CCR, и дополнительно включающий этапы применения схемы IL-2 и введения либо ингибитора PD-1, либо ингибитора PD-L1. В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение включает композицию, содержащую: (i) продукт TIL, генетически модифицированный для экспрессии CCR, (ii) схему IL-2 и (iii) либо ингибитор PD-1, либо ингибитор PD-L1. В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение включает набор, содержащий: (i) продукт TIL, генетически модифицированный для экспрессии CCR, (ii) схему IL-2 и (iii) либо ингибитор PD-1, либо ингибитор PD-L1.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение включает способ лечения пациента, страдающего от рака, включающий этапы применения схемы TIL, причем схема TIL включает продукт TIL, генетически модифицированный для экспрессии CCR, и дополнительно включающий этап введения ингибитора CTLA-4 и применения схемы IL-2. В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение включает композицию, содержащую: (i) продукт TIL, генетически модифицированный для экспрессии CCR, (ii) ингибитор CTLA-4 и (iii) схему IL-2. В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение включает набор, содержащий: (i) продукт TIL, генетически модифицированный для экспрессии CCR, (ii) ингибитор CTLA-4 и (iii) схему IL-2.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение включает способ лечения пациента, страдающего от рака, включающий этапы применения схемы TIL, причем схема TIL включает продукт TIL, генетически модифицированный для экспрессии CCR, и дополнительно включающий этапы применения схемы IL-2, введения ингибитора CTLA-4 и либо ингибитора PD-1, либо ингибитора PD-L1. В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение включает композицию, содержащую: (i) продукт TIL, генетически модифицированный для экспрессии CCR, (ii) схему IL-2, (iii) либо ингибитор PD-1, либо ингибитор PD-L1 и (iv) ингибитор CTLA-4. В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение включает набор, содержащий: (i) продукт TIL, генетически модифицированный для экспрессии CCR, (ii) схему IL-2, (iii) либо ингибитор PD-1, либо ингибитор PD-L1 и (iv) ингибитор CTLA-4.

B. Адоптивный перенос клеток.

Адоптивный перенос клеток (ACT) является эффективной формой иммунотерапии и включает перенос иммунных клеток с противоопухолевой активностью в организм пациентов, страдающих от рака. ACT представляет собой подход к лечению, который включает идентификацию in vitro лимфоцитов с противоопухолевой активностью, размножение in vitro этих клеток до большого числа клеток и их инфузию хозяину, страдающему от рака. Лимфоциты, применяемые для адоптивного переноса, могут быть получены из стромы резицированных опухолей (инфильтрирующие опухоль лимфоциты или TIL). TIL для ACT можно получить, как описано в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления TIL получают, например, в соответствии со способом, описанным на фиг. 2A и/или 9. Они также могут быть получены, или происходить, из крови, если они генетически модифицированы для экспрессии противоопухолевых Т-клеточных рецепторов (TCR) или химерных антигенных рецепторов (CAR), обогащены смешанными культурами опухолевых лимфоцитов (MLTC) или клонированы с помощью аутологичных антигенпрезентирующих клеток и пептидов, полученных из опухоли. ACT, в котором лимфоциты получены от имеющего рак хозяина, которому они вновь будут введены инфузией, называют аутологичным ACT. В патентной публикации США № 2011/0052530 описан способ проведения адоптивной клеточной терапии для стимуляции регрессии рака, главным образом, при лечении пациентов, страдающих от метастатической меланомы, полное описание данных способов включено посредством ссылки. В некоторых вариантах осуществления TIL могут быть введены, как описано в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления TIL могут быть введены в виде однократной дозы. Такое введение может осуществляться путем инъекции, например, внутривенной инъекции. В некоторых вариантах осуществления TIL и/или цитотоксические лимфоциты могут быть введены в нескольких дозах. Дозирование можно выполнять один раз, два раза, три раза, четыре раза, пять раз, шесть раз или более шести раз в год. Дозирование можно выполнять один раз в месяц, один раз каждые две недели, один раз в неделю или один раз через день. Введение TIL и/или цитотоксических лимфоцитов может продолжаться столько, сколько необходимо.

V. Координация производства продукта размножения клеток и лечебных событий пациента.

Как описано в настоящем документе, время от резекции опухоли у пациента до завершения производства TIL варьируется в зависимости от нескольких факторов, включая, например, размер опухоли, получаемой от пациента, количество клеток в конце различных стадий производства, количество дней, в течение которых выполняются различные стадии производства, и т.д. Как следствие, необходима определенная гибкость при планировании различных лечебных событий пациента. В некоторых вариантах осуществления лечебное событие пациента включает лимфодеплецию. В некоторых вариантах осуществления лечебное событие пациента включает инфузию TIL. В некоторых вариантах осуществления лечебное событие пациента включает процедуру лейкафереза. В некоторых вариантах осуществления лечебное событие пациента включает применение схемы IL-2. В некоторых вариантах осуществления лечебное событие пациента включает резекцию опухоли. В некоторых вариантах осуществления лечебное событие пациента включает пребывание в стационаре для лечения после процедуры.

Аспект настоящего изобретения обеспечивает систему для реализации описанных в настоящем документе способов. Система может включать в себя портал для пациентов, производственный портал, портал для врачей и логистический портал. Портал для пациентов позволяет пациенту или лицу, связанному с пациентом (например, лицу, осуществляющему уход, опекуну или законному представителю) (вместе именуемым в настоящем документе "пациент" для удобства), получить доступ к информации, относящейся к расписанию лечебных событий пациента. Портал для пациентов может потребовать от пациента предоставить сведения для аутентификации для доступа к этой информации. Портал для пациентов может также позволять пациенту изменять информацию, относящуюся к пациенту, такую как, например, адрес или другую личную информацию.

Портал для врачей, также называемый интерфейсом на стороне больницы, позволяет клинике (т.е. персоналу клиники) получать доступ и/или изменять информацию, относящуюся к пациенту, производственному процессу, производственным объектам, поставщику логистических услуг, а также информацию, относящуюся к различным лечебным события пациента, которые проводятся или будут проводиться в клинике.

Производственный портал связывается с интерфейсом на стороне больницы и логистическим порталом/логистическим интерфейсом для определения и передачи информации, относящейся к производственному процессу и/или доступности производственных интервалов. Производственный портал также позволяет создавать производственные этикетки, содержащие обновленную информацию о качестве на различных этапах производства, как описано в настоящем документе.

Логистический портал, также называемый в настоящем документе логистическим интерфейсом, связывается с производственным порталом, а интерфейс на стороне больницы обменивается информацией, относящейся к расписанию доставки материала (т.е. солидной опухоли или изготовленного продукта клеточной терапии) между клиникой и производственным предприятием, включая, например, производственное расписание, наличие производственных интервалов и расписание лечебных событий пациента, чтобы облегчить своевременную доставку материала.

Система для реализации различных способов, описанных в настоящем документе, может быть реализована в вычислительной системе либо посредством реализации собственной компьютерной программы, либо путем соответствующей модификации коммерчески доступной программной платформы, такой как, например, предоставляемая Vineti, Salesforce.com, Salesforce Health Cloud, IQVIA, TracSel и SAP.

Модификация имеющейся в продаже программной платформы для надлежащей реализации системы и выполнения одного или более описанных в настоящем документе способов может обеспечить выполнение платформой процессов, для которых она изначально не предназначалась. Другими словами, модификация в некоторых вариантах осуществления может быть основана на нетрадиционном применении различных инструментов, предоставляемых платформой. В некоторых вариантах осуществления система для реализации различных способов, описанных в настоящем документе, может включать в себя программную платформу, такую как рамочная программа, которая интегрирует систему планирования ресурсов предприятия (ERP), обеспечивающую автоматизацию логистических задач, и систему управления производством (MES), обеспечивающую автоматизацию производственных задач. Пример такой рамочной программы описан в патенте США № 7343605, который полностью включен в настоящий документ посредством ссылки.

Например, наряду с приложениями MES, приложения уровня управления предприятием (уровень планирования ресурсов предприятия) и уровня автоматизации (уровень управления) также могут быть интегрированы посредством рамочной программы и контролироваться или управляться посредством рабочей станции (например, в лечебном учреждении, на производственном предприятии или в курьерской службе). Таким образом, рамочная программа может стать интеграционной платформой для всего процесса лечения пациента, включая регистрацию пациента, получение опухоли, доставку опухоли на производственное предприятие, производство терапевтического или размноженного продукта клеточной терапии, доставку терапевтического продукта клеточной терапии в лечебное учреждение, назначение терапии пациенту и последующее лечение пациента. Различные приложения уровня управления предприятием, уровня MES и уровня автоматизации могут быть легко и экономично интегрированы рамоч-

ной программой с помощью адаптеров и/или оболочек. Таким образом, рамочную программу следует рассматривать как платформу программного обеспечения связующего звена и как инструмент интеграции производственных приложений. Конечный пользователь (например, куратор) может видеть соответствующий статус приложений, подлежащих контролю, посредством рабочей станции, а также может получать доступ к данным и способам приложений. Далее конечный пользователь может подключать приложения друг к другу с помощью этого доступа.

Таким образом, рамочная программа позволяет, во-первых, добиться вертикальной интеграции приложений с разных уровней предприятия, а во-вторых, рамочная программа обеспечивает горизонтальную интеграцию приложений на уровне MES.

Например, программный объект карточки, который позволяет хранить информацию на платформе, является общим определением типа хранимой информации. Например, программный объект карточки на готовой платформе позволяет хранить информацию о запросах клиентов. Для такого объекта может быть несколько записей, в которых хранится информация о конкретных экземплярах данных этого типа. Например, запись карточки для хранения информации о запросе на обучение человека и другая запись карточки для хранения информации о проблеме с конфигурацией другого человека. Эти объекты могут быть настроены для хранения информации, относящейся, например, к пациенту, лечебным события пациента для этого пациента и соответствующему расписанию.

Аналогичным образом автоматизированные действия, такие как уведомления и оповещения, и правила рабочего процесса, такие как действия бизнес-логики, предусмотренные в готовой платформе, могут быть изменены, чтобы инициировать изменения в расписаниях и этапах процесса, например, изменения в производственных процессах и последующие изменения в производственных расписаниях, наличии производственных интервалов и расписаниях лечебных событий пациента на основе результатов проверки качества (QA).

В некоторых вариантах осуществления система, описанная в настоящем документе, обеспечивает функции обеспечения качества для определения вероятных точек отказа в процессе производства, такие как описанные в патенте США № 10747209 и патенте США № 7799273, которые полностью включены в настоящий документ посредством ссылки.

В некоторых вариантах осуществления система, описанная в настоящем документе, обеспечивает системы данных, выполненные с возможностью поддержания целостности электронных записей о партиях, созданных в процессе производства конечного продукта клеточной терапии из солидной опухоли (или ее фрагмента), полученной от пациента, такие как описанные в патенте США № 8491839, который полностью включен в настоящий документ посредством ссылки. В некоторых вариантах осуществления система, описанная в настоящем документе, включает в себя прикладное программное обеспечение, адаптированное для применения в процессе производства клеток, при этом в процессе производства клеток получают размноженный продукт клеточной терапии, такой как терапевтическая популяция Т-клеток. Прикладное программное обеспечение выполнено с возможностью управления множеством устройств, включенных в закрытую систему для производства клеток, таких как газопроницаемые устройства.

В некоторых вариантах осуществления система, описанная в настоящем документе, интегрирует прикладное программное обеспечение и способы производства клеток, описанные в настоящем документе, чтобы обеспечить комплексный протокол проверки и обеспечения качества, который применяется множеством конечных пользователей, при этом данные, собранные из системы, анализируются и применяются для определения того, выполняются ли протоколы обеспечения качества и протоколы проверки.

В некоторых вариантах осуществления система применяет прикладное программное обеспечение к нескольким производственным линиям и/или нескольким предприятиям по производству клеток, при этом осуществляется контроль и управление несколькими линиями по производству клеток и несколькими производственными линиями с помощью одной и той же системы.

В некоторых вариантах осуществления система реализует способы, описанные в настоящем документе, в пакетной оптимизации систем культивирования клеток процесса производства клеток, при этом данные, собранные системой культивирования клеток, непрерывно отслеживаются в течение времени, и указанные данные применяются для анализа системы культивирования клеток. Кроме того, указанные данные интегрируются и применяются для анализа процесса контроля качества процесса производства клеток в целом.

В некоторых вариантах осуществления система, описанная в настоящем документе, позволяет спроектировать рабочие станции для выполнения различных этапов процесса производства конечного продукта клеточной терапии. Рабочие станции могут быть выполнены с возможностью проверки данных, связанных с предыдущим этапом, для обеспечения целостности выполняемого процесса и, по возможности, для принятия корректирующих действий. Примеры таких конструкций рабочих станций представлены в патенте США № 8041444, который полностью включен в настоящий документ посредством ссылки.

В некоторых вариантах осуществления система, описанная в настоящем документе, обеспечивает координацию между больничным учреждением и различными производителями, способными произво-

дить продукт клеточной терапии из солидной опухоли, полученной в больничном учреждении, путем предоставления доступа к доступным производственным расписаниям у различных производителей. Примеры систем, обеспечивающих такую координацию, представлены в патенте США № 8069071, который полностью включен в настоящий документ посредством ссылки.

В некоторых вариантах осуществления система, описанная в настоящем документе, основана на облачной архитектуре, которая позволяет различным организациям, связанным с производством продукта клеточной терапии, получать доступ в режиме реального времени (с соответствующими разрешениями) к информации, относящейся к производству и транспортировке продукта клеточной терапии. Примеры такой облачной архитектуры представлены в патенте США № 9965562, который полностью включен в настоящий документ посредством ссылки.

В некоторых вариантах осуществления система, описанная в настоящем документе, позволяет персоналу, связанному с получением опухоли от пациента, изготовлением продукта клеточной терапии из полученной опухоли и транспортировкой опухоли и продукта клеточной терапии, идентифицировать и аутентифицировать себя с помощью электронных подписей для управления процессами и их утверждения, как описано в публикации заявки на патент США № 2004/0243260, которая полностью включена в настоящий документ посредством ссылки.

В некоторых вариантах осуществления система может дополнительно содержать или включать в себя подсистему управления взаимоотношениями с клиентами (CRM).

Подсистема CRM может архивировать информацию, относящуюся к различным сторонам, таких как, например, врачи, больничные сайты, медсестры, лица, выставляющие счет, деловые контакты и т.д. Информация поддерживается с подсистемой CRM, чтобы обеспечить поддержание единого представления сторон в одной унифицированной последовательности, что позволяет совместно применять представления потенциальных клиентов и сторон на платформе в единой последовательности конфиденциальным образом в рамках системы. Информация, относящаяся к взаимосвязи между сторонами, может совместно использоваться в распределенном контексте в режиме "ведущий-ведущий", "ведомый-ведомый" или в одноранговом режиме частично или полностью анонимно путем удаления личной информации с одной или более распределенных ведомых или одноранговых систем CRM. Один из примеров такой подсистемы CRM описан в публикации патента США № 2014/0244351, патенте США № 8489451 и патенте США № 9342292, каждый из которых полностью включен в настоящий документ посредством ссылки.

В некоторых вариантах осуществления система, описанная в данном документе, может быть выполнена с возможностью предоставления сети, которая включает в себя центральную подсистему обработки событий для получения, обработки и маршрутизации сообщений, вызванных медицинскими событиями в реальном времени и/или производственными событиями. Например, центральная система обработки событий может идентифицировать информацию о пациентах, связанную с медицинским событием, и сопоставлять информацию о пациенте с одним или более из плана медицинского обслуживания, местоположения клиники, предприятия, производящего TIL, и/или поставщика логистических услуг. После сопоставления медицинского и/или производственного события с заинтересованными сторонами, центральная подсистема обработки событий может направить по меньшей мере часть информации, относящейся к медицинскому и/или производственному событию одной или более заинтересованным сторонам в течение короткого периода времени после инициирующего события (например, практически в режиме реального времени). Например, на основе правил, связанных с каждой заинтересованной стороной, центральная система обработки событий может направить информацию и/или выдать предупреждение или уведомление заинтересованной стороне, чтобы заинтересованная сторона была осведомлена о медицинском событии. Пример такой центральной подсистемы обработки событий описан в публикации патента США № 2014/0372147 и патенте США № 10242060, каждый из которых полностью включен в настоящий документе посредством ссылки.

В некоторых вариантах осуществления система, описанная в настоящем документе, выполнена с возможностью выбора рабочего процесса для схемы лечения рака, включая лечебные события пациентов, такие как, например, резекция опухоли, лимфодеплеция, лейкаферез, инфузия TIL и/или схема IL-2 или другие лечебные события пациента, описанные в настоящем документе. После выбора рабочего процесса система может создать порядок покупки, соответствующий клеточной инфузионной терапии от имени пациента, причем порядок, соответствующий клеточной инфузионной терапии, включает в себя по меньшей мере одно из запроса на заказ клеток и запроса на указанную схему лечения, соответствующую лечению рака. Примеры такой подсистемы выбора рабочего процесса описаны в публикации патента США № US 2014/0088985, которая полностью включена в настоящий документ посредством ссылки.

В некоторых вариантах осуществления система может включать в себя подсистему телефонии, которая может включать в себя аутентификацию запросов на обслуживание, включая аутентификацию устройства удаленного доступа до текстового или звукового общения с пациентом или представителем пациента. В некоторых вариантах осуществления аутентификация может быть выполнена путем автоматической аутентификации устройства удаленного доступа или задания вопросов пациенту (или представителю). Пример такой подсистемы телефонии и способа аутентификации описан в публикации патента

США № US 2019/0026747, которая полностью включена в настоящий документ посредством ссылки.

А. Система координации производства продукта размножения клеток.

Варианты осуществления настоящего изобретения включают способ и систему для координации производства продукта клеточной терапии, такого как, например, Т-клетки или TIL для пациента, и динамическое планирование различных стадий производственного процесса, а также различные лечебные события пациента на основе хода выполнения и успеха различных стадий производственного процесса.

Способы и системы, описанные в настоящем документе, дополнительно выполнены с возможностью обеспечения конкретного технического преимущества перед существующими системами обеспечения непрерывной и автоматической цепочки ответственности и цепочки идентификации для специфичного для пациента биологического образца во время процедуры иммунотерапии, чтобы создать компьютеризированный информационный портал, который заинтересованные стороны, такие как пациент, врач, производитель и другой медицинский персонал, могут использовать для быстрого понимания и отслеживания текущей фазы процедуры иммунотерапии и статуса биологического образца пациента во время процедуры. Отсутствие способности поддерживать цепочку ответственности и цепочку идентификации, что приводит к задержкам во время производственного процесса, которые могут иметь неизмеримо серьезные последствия для пациента, страдающего от опасного для жизни заболевания.

Варианты осуществления настоящего изобретения обеспечивают поддержание цепочки ответственности для биологического материала в процессе производства (включая обеспечение качества, производство, контроль готовой продукции и завершение отгрузки), а также цепочки ответственности для биологического материала в течение процесса доставки конечного продукта (включая отгрузку и доставку на место проведения инфузии). Варианты осуществления настоящего изобретения дополнительно позволяют непрерывно и постоянно ассоциировать цепочку ответственности с конкретным пациентом, тем самым обеспечивая полную цепочку идентификации между пациентом и биологическим материалом на всех этапах производства.

Поддержание цепочки ответственности (COC) и цепочки идентификации (COI) выполняется путем связывания каждого события в течение всего пути биологического материала от пациента через транспортировку, производственный процесс и транспортировку обратно к пациенту с идентификатором заказа клеток и специфичным для пациента идентификатором (т.е. уникальным для пациента) и отслеживания каждого события в течение всего пути.

Кроме того, способы и системы, описанные в настоящем документе, выполнены с возможностью интеграции и синхронизации получения живой ткани от пациента с производственным процессом, а также обеспечения возможности проверки каждого этапа от получения живой ткани до введения продукта клеточной терапии и последующих лечебных событий для COC и COI.

Способы и системы, описанные в настоящем документе, дополнительно выполнены с возможностью координации логистики для получения живой ткани от пациента, доставки живой ткани на выбранное производственное предприятие, производства продукта клеточной терапии на выбранном производственном предприятии и доставки продукта клеточной терапии от производственного предприятия в клинику для лечения пациента.

На фиг. 3А показана блок-схема системы координации производства продукта клеточной терапии для пациента в соответствии с вариантом осуществления настоящего изобретения. В некоторых вариантах осуществления функции, выполняемые компонентами на фиг. 3А, могут быть интегрированы в один компонент. Кроме того, в некоторых вариантах осуществления функции, выполняемые одним или более компонентами на фиг. 3А, также могут выполняться другими компонентами на фиг. 3А.

Как показано на фиг. 3А, система 300 может включать в себя интерфейс 110 на стороне больницы, планировщик 120 событий, логистический интерфейс (также называемый в настоящем документе курьерским порталом) 130 и/или производственный портал 140. Каждый из интерфейса 110 на стороне больницы, планировщика 120 событий, логистического интерфейса 130 и производственного портала 140 обменивается данными с тремя другими, например, с помощью сети связи, такой как LAN, WAN (например, Интернет) и /или сотовая сеть.

В некоторых вариантах осуществления интерфейс 110 на стороне больницы, планировщик 120 событий, логистический интерфейс 130, производственный портал 140 и соответствующие модули (показаны, например, на фиг. 3) надлежащим образом модифицированы или построены на коммерчески доступных программных платформах, таких как, например, предоставляемые Vineti, Salesforce.com, Salesforce Health Cloud, IQVIA, TracSel и SAP.

Интерфейс 110 на стороне больницы может быть связан или может взаимодействовать с больницей или другим учреждением, ответственным за администрирование лечения пациента, например, предоставление терапии рака, как описано в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления интерфейс 110 со стороны больницы связан с клиническим учреждением, которое выполняет процедуру получения солидной опухоли у пациента и получения продукта клеточной терапии из солидной опухоли или ее фрагментов. В некоторых вариантах осуществления клиническое учреждение функционирует только для получения солидной опухоли, в то время как процесс получения продукта клеточной терапии из солидной опухоли или ее фрагментов может осуществляться на производственном предприятии.

В некоторых вариантах осуществления интерфейс 110 со стороны больницы связан с больницей, которая выполняет инфузию размноженного продукта клеточной терапии, полученного на производственном предприятии, и обеспечивает последующий уход и/или любое предшествующее или последующее лечение пациента. Клиницисты или сотрудники больницы или клиники могут взаимодействовать с системой 300 через интерфейс 110 на стороне больницы.

В некоторых вариантах осуществления интерфейс 110 на стороне больницы включает в себя одно или более вычислительных устройств, таких как, например, настольный компьютер, облачный сервер, портативный компьютер, мобильные устройства или любое другое вычислительное устройство, включая аппаратные и программные модули, которые исполняются на процессоре и взаимодействуют с запоминающим устройством. Интерфейс 110 на стороне больницы может быть подключен через проводное или беспроводное соединение к вычислительным устройствам, эксплуатируемым в больничном или клиническом учреждении или связанным с ним.

В некоторых вариантах осуществления интерфейс 110 на стороне больницы может включать модуль 112 отслеживания, выполненный с возможностью отслеживания биологического материала (например, опухоли пациента, Т-клеток, полученных от пациента, размноженных Т-клеток на различных стадиях процесса размножения Т-клеток и т.д.) от пациента с момента извлечения из организма пациента до момента инфузии в организм пациента.

В некоторых вариантах осуществления, когда пациент регистрируется для инфузионного лечения TIL, создается запрос на заказ клеток для производства размноженного продукта клеточной терапии для пациента и генерируется идентификатор заказа клеток, связанный с запросом на заказ клеток. В некоторых вариантах осуществления заказ на покупку генерируется в соответствии с запросом на заказ клеток и загружается в систему из больничного учреждения. В некоторых вариантах осуществления система может включать в себя интерфейс для генерирования и/или загрузки заказа на покупку.

Кроме того, генерируется специфичный для пациента идентификатор, уникальный для пациента, который связан с идентификатором заказа клеток. В некоторых вариантах осуществления специфичный для пациента идентификатор может включать, например, идентификатор пациента с последовательным суффиксом, где суффикс представляет собой одну букву, добавляемую последовательно для каждого пациента (А-Я). Специфичный для пациента идентификатор уникален в системе. В некоторых вариантах осуществления специфичный для пациента идентификатор может быть виден только определенным лицам (подробно описанным в другом месте настоящего документа). В некоторых вариантах осуществления специфичный для пациента идентификатор печатается на каждой этикетке, печатаемой на протяжении всего пути биологического материала пациента, а также на изготовленном биологическом материале. В некоторых вариантах осуществления специфичный для пациента идентификатор доступен только для чтения всем пользователям системы. Другими словами, специфичный для пациента идентификатор в некоторых вариантах осуществления не может быть отредактирован после его генерирования.

В некоторых вариантах осуществления идентификатор заказа клеток может включать в себя информацию, такую как, например, уникальный идентификатор пациента, идентификатор заказа клеток, код заказа, номер партии заказа клеток, значения одного или более параметров приемлемости в различные моменты времени, один или более индикаторов, указывающих на то, соблюдаются ли критерии приемлемости в различные моменты времени, или их комбинацию.

В некоторых вариантах осуществления идентификатор заказа клеток и специфичный для пациента идентификатор сканируются в каждый момент времени, когда любой биологический материал (например, солидная опухоль, извлеченная из организма пациента, ее фрагменты, продукт клеточной терапии, извлеченный из нее, или размноженный продукт клеточной терапии, полученный путем размножения продукта клеточной терапии), связанный с пациентом, передается или подвергается обработке. Каждое сканирование может быть зарегистрировано и проверено модулем 112 отслеживания в течение всего процесса с момента извлечения из организма пациента до момента инфузии в организм пациента. Проверка специфичного для пациента идентификатора на каждом этапе в течение всего процесса обеспечивает цепочку идентификации (COI) продукта, в то время как проверка идентификатора заказа клеток на каждом этапе в течение всего процесса обеспечивает цепочку ответственности (COC) продукта. Подробная информация, относящаяся к поддержанию COI и COC, приведена в других разделах настоящего документа.

В некоторых вариантах осуществления отсканированная информация сверяется с заказом на покупку, сгенерированным больничным учреждением. Например, когда доставка принимается на производственном предприятии, этикетка на транспортном контейнере может быть отсканирована, а информация на этикетке может быть сверена с заказом на покупку для обеспечения точности. В некоторых вариантах осуществления результат проверки регистрируется в системе.

Следует понимать, что хотя модуль 112 отслеживания показан на фиг. 3А и описан в настоящем документе как часть интерфейса 110 на стороне больницы, модуль 112 отслеживания может быть реализован как автономное вычислительное устройство, имеющее процессор и запоминающее устройство в некоторых вариантах осуществления. Аналогичным образом модуль 112 отслеживания также может быть реализован как автономный программный модуль (например, хранящийся на облачном сервере) в некоторых вариантах осуществления.

В некоторых вариантах осуществления интерфейс 110 на стороне больницы может обеспечивать ограниченный доступ для пациента через модуль 116 доступа пациента, чтобы позволить пациенту получать информацию, относящуюся к процедурам лечения и соответствующим расписаниям. Модуль 116 доступа пациента может также позволять пациенту предоставлять информацию, относящуюся к самому себе, такую как, например, личную идентификационную информацию, информацию о страховке и информацию, относящуюся к состоянию его здоровья, для клиницистов.

Интерфейс 110 на стороне больницы может дополнительно включать в себя модуль 114 получения, позволяющий персоналу клинического учреждения получать солидную опухоль от пациента в соответствии с заданным протоколом и вводить информацию, относящуюся к процедуре получения солидной опухоли от пациента. Информация, относящаяся к процедуре получения солидной опухоли может, в некоторых вариантах осуществления, быть заархивирована, чтобы обеспечить аудит постфактум для обеспечения соответствия нормативным требованиям.

В некоторых вариантах осуществления модуль 114 получения может дополнительно позволять персоналу клинического учреждения предоставлять производственному предприятию информацию о солидной опухоли и процессах, применяемых для получения солидной опухоли от пациента. В вариантах осуществления, в которых клиническое учреждение также может получать продукт клеточной терапии из солидной опухоли, модуль 114 получения может позволять персоналу клинического учреждения предоставлять информацию о полученном продукте клеточной терапии, такую как, например, процесс или процедура, применяемые для получения продукта клеточной терапии, а также результаты анализов контроля качества, проведенного в отношении полученного продукта клеточной терапии, производственному предприятию.

В некоторых вариантах осуществления интерфейс 110 на стороне больницы может дополнительно включать в себя модуль 118 координации производства. Модуль 118 координации производства выполнен с возможностью получения пользователями в клиническом учреждении информации, относящейся к одному или более производственным предприятиям, такую как, например, доступность производственных интервалов и возможностей, доступных на каждом из одного или более производственных предприятий. Модуль 118 координации производства дополнительно позволяет пользователям в клиническом учреждении координировать резервирование производственного интервала на выбранном производственном предприятии и координировать свои действия с поставщиком логистических услуг через логистический интерфейс 130 для организации транспортировки солидной опухоли, ее фрагментов или продукта клеточной терапии, полученного от пациента. Модуль 118 координации производства дополнительно позволяет пользователям в клиническом учреждении получать информацию, касающуюся производственного процесса и/или анализов контроля качества, выполняемых в ходе производственного процесса, через производственный портал 140.

Планировщик 120 событий выполнен с возможностью координации планирования различных действий, выполняемых в клиническом учреждении и на производственном предприятии. Дополнительно или в качестве альтернативы планировщик 120 событий может предоставлять информацию, относящуюся к планированию различных действий, поставщику логистических услуг, чтобы облегчить транспортировку продукта клеточной терапии между клиническим учреждением и производственным предприятием, предприятием по производству продукта клеточной терапии, например, предприятием, где происходит размножение продукта клеточной терапии. Как более подробно описано ниже, на основе различных событий, которые происходят во время производства продукта клеточной терапии, планировщик событий выполнен с возможностью динамического планирования, когда должно произойти другое(ие) событие(я).

В некоторых вариантах осуществления планировщик 120 событий включает в себя вычислительное устройство 122, такое как, например, настольный компьютер, сервер, портативный компьютер, мобильные устройства или любое другое вычислительное устройство, включая аппаратные и программные модули, которые исполняются на процессоре и взаимодействуют с запоминающим устройством. Аппаратные и/или программные модули включают в себя модуль 123 определения приемлемости и модуль 125 планирования. В некоторых вариантах осуществления вычислительное устройство 122 может представлять собой облачный сервер, доступный через больничный интерфейс 110, производственный портал 140 и логистический интерфейс 130. Планировщик 120 событий может быть подключен через проводное или беспроводное соединение к вычислительным устройствам, эксплуатируемым на производственном предприятии и/или в больничном учреждением или связанным с ними.

Следует понимать, что хотя модуль 123 определения приемлемости показан на фиг. 3А как часть планировщика 120 событий, модуль 123 определения приемлемости также может быть реализован как часть производственного портала 140. В качестве альтернативы модуль 123 определения приемлемости также может быть реализован как автономный программный модуль, например, размещенный на облачном сервере.

Логистический интерфейс или курьерский портал 130 могут быть связаны или могут взаимодействовать с поставщиком логистических услуг, таким как, например, курьерская служба или служба обработки посылок.

В некоторых вариантах осуществления логистический интерфейс 130 включает в себя одно или более вычислительных устройств, таких как, например, настольный компьютер, облачный сервер, портативный компьютер, мобильные устройства или любое другое вычислительное устройство, включая аппаратные и программные модули, которые исполняются на процессоре и взаимодействуют с запоминающим устройством. Логистический интерфейс 130 может быть подключен через проводное или беспроводное соединение через сеть, такую как Интернет, к вычислительным устройствам, эксплуатируемым поставщиком логистических услуг, или связанным с ним.

Производственный портал 140 может быть связан с производственным предприятием, производящим размноженный продукт клеточной терапии. Производственный портал 140 позволяет персоналу на производственном предприятии контролировать и регистрировать различные процессы во время производства размноженного клеточного продукта, включая, например, поддержание цепочки идентификации и цепочки ответственности, регистрацию информации, относящейся к анализам контроля качества, проводимым во время производства, регистрацию перехода между различными процессами и обеспечение этикеток для контейнеров для продукта клеточной терапии во время процесса размножения.

В некоторых вариантах осуществления производственный портал 140 включает в себя одно или более вычислительных устройств, таких как, например, настольный компьютер, облачный сервер, портативный компьютер, мобильные устройства или любое другое вычислительное устройство, включая аппаратные и программные модули, которые исполняются на процессоре и взаимодействуют с запоминающим устройством. Производственный портал 140 может быть подключен через проводное или беспроводное соединение к вычислительным устройствам, эксплуатируемым на производственном предприятии или связанным с ним.

В некоторых вариантах осуществления производственный портал 140 включает в себя модуль 142 маркировки и модуль 144 COC/COI. Модуль 142 маркировки позволяет персоналу производственного предприятия генерировать этикетки для контейнеров, содержащих продукт клеточной терапии, в процессе производства размноженного продукта клеточной терапии (также называемого в настоящем документе процессом размножения). Этикетки могут включать такую информацию, как, например, специфичный для пациента идентификатор, идентификатор, относящийся к персоналу, работающему с контейнером и/или выполняющему текущий и/или предыдущий этап процесса размножения, результаты контроля качества, пройденного на предыдущем этапе, код причины, относящийся к причине генерирования этикетки, штрих-код или двумерный код (например, QR-код), идентифицирующий продукт клеточной терапии со специфичным для пациента идентификатором, и другую подходящую информацию.

Модуль 144 COC/COI позволяет пользователям, связанным с производственным предприятием, поддерживать возможность аудита цепочки ответственности в процессе размножения. Модуль 144 COC/COI дополнительно позволяет пользователям, связанным с производственным предприятием, поддерживать возможность аудита цепочки идентификации пациента, связанного с размноженным продуктом клеточной терапии.

На фиг. 3B показана схема объектов для компонентов системы 300, которые надлежащим образом модифицированы или построены на основе коммерчески доступных программных платформ в дополнение к стандартным компонентам для этих платформ. Например, коммерчески доступная программная платформа может иметь встроенные объекты, соответствующие доступу пациента (включая, например, идентификатор пациента, контактную информацию пациента, информацию аутентификации пациента и т.д.), план лечения (включая, например, начальное расписание лечебных событий пациента), доступ клинициста (например, идентификатор клинициста и информация для аутентификации клинициста) и доступ производства (например, контактная информация для производственных предприятий).

С другой стороны, такие объекты, как формы получения опухоли, связанные с процедурой получения солидной опухоли от пациента, производственный заказ, включающий информацию, относящуюся к процессам, которые будут применяться для производства размноженного продукта клеточной терапии, и информацию, относящуюся к тому, как полученная солидная опухоль была обработана, расписание производства на одном или более производственных предприятиях, контрольный журнал этикеток для обеспечения аудита всего процесса, могут быть специально созданы для взаимодействия со встроенными объектами, чтобы обеспечить конкретные функциональные возможности, связанные с системой 300.

Специальные объекты и встроенные объекты настраиваются в системе 300 для взаимодействия друг с другом, чтобы обеспечить поддержку и контроль COC и COI на протяжении всех событий от получения солидной опухоли от пациента до инфузии размноженного продукта клеточной терапии в организм пациента. Специальные объекты в сочетании со встроенными объектами, а также планирование лечебных событий пациента и связанной с ними логистики в зависимости от хода выполнения производственных процессов.

Например, в некоторых вариантах осуществления в системе 300 могут быть предоставлены специальные объекты, такие как записи о партиях и контрольные журналы этикеток. Эти специальные объекты, в дополнение к специальным средствам автоматизации рабочего процесса и специальным профилям пользователей, обеспечивают коммерчески доступную программную платформу с такими функциями, как, например, поддержка COC/COI, возможность аудита, динамическое планирование лечебных собы-

тий пациента на основе управления производством, генерирование этикеток на основе управления производством и/или взаимодействие между управлением производством и получением, которые изначально не были предусмотрены в коммерчески доступной программной платформе. Дополнительные сведения о взаимодействии между специальными объектами и встроенными объектами для процедуры получения опухоли, поддержки COC и COI и генерирования меток в процессе производства приведены в других разделах настоящего документа.

B. Взаимодействие между специальными и встроенными объектами для поддержки COC и COI.

На фиг. 3C-3E схематически показано отслеживание биологического материала в процессе производства на производственном предприятии в соответствии с некоторыми вариантами осуществления настоящего изобретения. В некоторых вариантах осуществления первоначально, когда образец опухоли, полученный от пациента в клиническом учреждении, доставляется на производственное предприятие, транспортная этикетка сканируется, и информация, полученная в результате сканирования, связывается с соответствующими компьютерными объектами в системе. Информация может включать, помимо прочего, идентификатор заказа клеток, специфичный для пациента идентификатор, время резекции опухоли, процессы, применяемые для резекции опухоли, процессы, применяемые для хранения опухоли после резекции, и ожидаемые процессы, которые будут применяться для размножения продукта клеточной терапии из опухоли. После проверки информации о пациенте, полученной в результате сканирования, относительно запроса на заказ клеток, который отдельно принимается на производственном предприятии (например, через производственный портал 140), опухоль указывается в системе как принятая на производственном предприятии, и цепочка ответственности переходит к производственному предприятию. Подробна информация о том, как цепочка ответственности и цепочка идентификации поддерживаются в процессе производства, приведена в других разделах настоящего документа.

Затем опухоль переходит к проверке качества. Во время проверки качества информация об опухоли, полученная при сканировании, дополнительно проверяется, чтобы убедиться в том, что образец опухоли соответствует необходимым критериям качества. Информация, проверяемая в этом процессе, включает, например, информацию, относящуюся к процессам, применяемым для резекции опухоли, и процессам, применяемым для хранения и транспортировки опухоли после резекции. Информация, относящаяся к процессам, применяемым для резекции опухоли, может включать, например, различные поля, обработанные из формы получения опухоли, которая дополнительно подробно описана в других разделах настоящего документа. Когда считается, что опухоль соответствует критериям качества, сканируют соответствующую этикетку и обновляют соответствующие объекты. Обновленная информация, включенная в объекты, доступна во всей системе, включая, например, в больничном учреждении, а также у поставщика логистических услуг (также называемого в настоящем документе курьерской службой). В некоторых вариантах осуществления различные процессы, связанные с больничным учреждением и курьерской службой, обновляются на основе обновленных объектов.

Затем опухоль переходит к производству. Затем сканируют этикетку с записью партии нулевого дня, чтобы убедиться в том, что соответствующий образец опухоли переходит к производству и будет обработан с помощью соответствующих производственных процессов. Затем опухоль перемещают в соответствующую колбу (которая содержит среду и реагенты для процесса размножения, с помощью которого должна быть обработана опухоль пациента), и сканируют этикетку колбы. Соответствующие объекты обновляются с помощью информации, полученной в результате сканирования с соответствующими метками времени.

Затем колбу нулевого дня вручную перемещают в помещение инкубатора, откуда ее перемещают в производственное помещение. В производственном помещении этикетку колбы снова сканируют и информацию, содержащуюся на ней, записывают. Информация с этикетки колбы также применяется для обеспечения соблюдения соответствующих производственных процессов.

После первого необходимого периода времени (например, 11 дней, показанных на фиг. 3C) в зависимости от конкретного производственного процесса колбу засевают. В процессе засевания может потребоваться удаление колбы из производственного помещения. В таких случаях этикетку флакона сканируют, а запись о партии обновляют до и после того, как колба покидает производственное помещение. Информация до и после сканирования сопоставляется до выполнения дополнительных процессов.

После процесса засевания колбу снова переносят в производственное помещение. Этикетку колбы сканируют до и после повторного переноса в производственное помещение после процесса засевания, и записи о партиях обновляют. Информацию, полученная до и после сканирования, сопоставляют, чтобы убедиться в том, что применяется правильная колба, и для дальнейшей обработки продукта клеточной терапии применяются соответствующие дополнительные процессы.

После второго необходимого периода времени (например, в день 16, показанный на фиг. 3C),клетки из засеянной колбы разделяют на множество пакетов (например, 5 пакетов, показанных на фиг. 3C). Этикетки для каждого из пакетов сканируют до и после повторного переноса в производственное помещение, а записи о партиях и соответствующие объекты соответствующим образом обновляют. Информация, полученная до и после сканирования, применяется для проверки того, что клетки из колбы разделены в соответствии с запросом на заказ клеток и что пакеты подвергаются дополнительной обработке с помощью соответствующих производственных процессов.

В некоторых вариантах осуществления анализ качества выполняется в первый и второй необходимые моменты времени, чтобы убедиться в том, что производственный процесс протекает в соответствии с запросом на заказ клеток и в соответствии с заданным расписанием. В таких вариантах осуществления результаты контроля качества также могут быть включены в отсканированную информацию. При получении такой информации в результате соответствующих сканирований, если определяется, что качество продукта клеточной терапии, полученного в соответствующий момент времени, не соответствует определенным критериям качества, запись о партии и соответствующие объекты обновляют соответствующим образом. При необходимости также обновляют расписание производственного процесса. В некоторых вариантах осуществления обновленное расписание может быть сообщено больничному учреждению, а также курьеру, так что расписания соответствующих процессов, которые должны выполняться в больничном учреждении и курьером, могут быть соответствующим образом обновлены. Подробная информация о том, когда и как обновляется расписание производства, приведена в других разделах настоящего документа.

Затем производственный процесс продолжается (либо по расписанию, либо с соответствующим образом измененным расписанием и/или промежуточными этапами) во множестве пакетов до заданной конечной точки. В некоторых вариантах осуществления клетки из одного из множества пакетов применяются для проведения анализов качества конечного размноженного продукта клеточной терапии. Пакет, выбранный из анализа качества, а также пакеты, содержащие клетки, которые должны быть выпущены в качестве конечного продукта, затем маркируют, а этикетки сканируют для обновления записей о партиях и соответствующих объектов.

Пакеты, которые должны быть выпущены в качестве конечного продукта, затем помещают в кассеты и замораживают для транспортировки в лечебное учреждение. Этикетки для кассет сканируют, а записи о партиях обновляют вместе с соответствующими объектами. Затем сканируют этикетку для пакета, который будет применяться для проведения анализов контроля качества, обновляют запись о партии и соответствующие объекты, а пакет перемещают на станцию контроля качества. После получения результатов контроля качества результаты сканируют, а записи о партиях и соответствующие объекты обновляют.

В некоторых вариантах осуществления пакеты, которые должны быть выпущены в качестве конечного продукта, могут быть переданы курьеру (и, в конечном счете, больничному учреждению) с оговоркой, что продукт в пакетах еще не одобрен для применения в терапии пациента, поскольку результаты анализов качества еще не доступны. В таких вариантах осуществления соответствующие объекты обновляют в режиме реального времени при получении результатов анализа качества, тем самым сокращая время доставки конечного продукта клеточной терапии пациенту.

Как только результаты анализа качества показывают, что конечный продукт клеточной терапии одобрен для терапевтического применения у пациента, кассеты сканируют, а записи о партиях и соответствующие объекты обновляют. Затем кассеты готовят к транспортировке, передают поставщику логистических услуг (т.е. курьеру) и сканируют, указывая, что цепочка ответственности перешла к курьеру.

Затем курьер доставляет конечный продукт клеточной терапии в лечебное учреждение, где этикетки снова сканируют, чтобы указать, что цепочка ответственности перешла к лечебному учреждению. Записи о партиях и соответствующие объекты обновляют таким образом, чтобы производственное предприятие и курьер были уведомлены о том, что конечный продукт клеточной терапии доставлен в лечебное учреждение.

C. Маркировка продукта клеточной терапии в процессе производства и поддержание цепочки ответственности и цепочки идентификации.

На фиг. 3F схематически показан процесс поддержания COC и COI на протяжении всего пути продукта клеточной терапии от получения солидной опухоли посредством процесса производства до инфузии в организм пациента в соответствии с некоторыми вариантами осуществления процесса производства (например, процесс GEN 2 или процесс GEN 3). В некоторых вариантах осуществления интерфейс 110 на стороне больницы изначально принимает информацию о пациенте от сотрудника (например, медсестры) в больнице, подключенной к интерфейсу 110 на стороне больницы. Информация о пациенте может включать информацию о медицинском страховании, личную информацию, информацию, связанную со здоровьем, информацию о регистрации пациента (например, формы согласия) или любую другую информацию, относящуюся к пациенту, которая может быть полезна для идентификации пациента и ухода за ним.

После того, как сотрудник, например клиницист, больницы определил пациента как кандидата, например, для инфузионной терапии TIL, пациент может дать согласие на продолжение инфузионной терапии TIL через компьютер, подключенный к интерфейсу 110 на стороне больницы.

Затем сотрудник больницы может заказать инфузионную терапию TIL для пациента через планировщик 120 событий. Затем сотрудник отдела выставления счетов больницы может разместить заказ на покупку инфузионной терапии TIL для пациента через логистический интерфейс 130. Заказ на инфузионную терапию TIL и заказ на покупку могут быть переданы в интерфейс 110 на стороне больницы. Интерфейс 110 на стороне больницы может подтверждать получение заказа и заказа на покупку, а также

подтверждать регистрацию пациента и оформления согласия до выдачи запроса на заказ клеток планировщику 120 событий. Аналогичным образом, интерфейс на стороне больницы может связываться с поставщиком страховых услуг, чтобы уведомлять о том, что были запланированы различные лечебные события пациента, а также может предоставлять расписание лечебных событий пациента поставщику страховых услуг для обработки платежа.

Затем специфичный для пациента идентификатор может быть связан с запросом на заказ клеток и прикреплен к биологическому материалу, связанному с пациентом, на каждом этапе обработки и/или доставки, чтобы обеспечить непрерывное отслеживание цепочки ответственности и цепочки идентификации для биологического материала, как подробно описано далее в настоящем документе. Специфичный для пациента идентификатор также может быть связан с пациентом, а также с лечебным оборудованием, применяемым для управления различными процессами лечения пациента, чтобы отслеживать пациента на протяжении всей схемы лечения.

Специфичный для пациента идентификатор также может быть сообщен поставщику страховых услуг через интерфейс 110 на стороне больницы, чтобы обеспечить возможность обработки платежа после различных лечебных событий пациента. Специфичный для пациента идентификатор может быть дополнительно сообщен курьеру через курьерский портал 130, чтобы курьер мог проверить личность пациента, связанного с транспортируемым биологическим материалом.

В различных вариантах осуществления, описанных в настоящем документе, любая связь между модулем 125 планирования и интерфейсом 110 на стороне больницы, производственным порталом 140 или логистическим интерфейсом 130, относящаяся к расписанию производственных событий и/или лечебных событий пациента (независимо от того, изменены они или нет), сопровождается специфичным для пациента идентификатором, связанным с обрабатываемым и запланированным запросом на заказ клеток. Такая связь, включая специфичный для пациента идентификатор, позволяет интерфейсу 110 на стороне больницы, производственному порталу 140 и логистическому интерфейсу 130 точно обрабатывать, отслеживать и идентифицировать биологический материал, тем самым избегая ошибочной идентификации биологического материала или пациента и повышая безопасность пациента.

Кроме того, как подробно описано в настоящем документе, специфичный для пациента идентификатор применяется для генерирования этикеток для контейнеров, применяемых в процессе размножения, для обеспечения возможности поддержания COC/COI в процессе размножения и обеспечения возможности аудита постфактум на предмет соответствия нормативным требованиям.

В некоторых вариантах осуществления специфичный для пациента идентификатор может быть включен в идентификатор заказа клеток, структура которого также позволяет применять его для отслеживания цепочки идентификации/цепочки ответственности, а также для отслеживания истории событий. В некоторых вариантах осуществления идентификатор заказа клеток, в дополнение к специфичному для пациента идентификатору, может включать в себя несколько знаков или полей, каждое из которых соответствует биологическому материалу от пациента, прошедшему некоторый этап обработки. На фиг. 3G представлено репрезентативное изображение этикетки для продукта клеточной терапии в соответствии с некоторыми вариантами осуществления. В некоторых вариантах осуществления этикетка включает идентификатор 350 заказа клеток, 2D-код (например, QR-код) 362, поле 370 причины и поле 380 продукта. Идентификатор 350 заказа клеток может включать в себя различные поля, такие как, например, имя 354 пациента, специфичный для пациента идентификатор 352, дата 356 рождения пациента (например, для дополнительной проверки), идентификатор 358 пациента, связанный с больницей, и номер 360 производственной партии.

Таким образом, этикетка позволяет поддерживать COI/COC, а также позволяет отслеживать материалы, полученные в результате резекции опухоли в центре клинического лечения, доставку опухолевого материала на производственное предприятие, производство, включая тестирование всех образцов в процессе производства и готовой продукции, доставку лекарственного препарата в центр клинического лечения и инфузию лекарственного препарата.

В некоторых вариантах осуществления разные этикетки могут быть сгенерированы в разные моменты времени на пути продукта клеточной терапии от получения солидной опухоли через производственный процесс до инфузии в организм пациента, как показано на фиг. 3H. Этикетки, сгенерированные в разные моменты времени, могут включать в себя дополнительную или отличную информацию, чем та, что включена в этикетку, показанную на фиг. 3G. Например, в некоторых вариантах осуществления этикетки, сгенерированные в процессе размножения клеток, которые, например, прикрепляются к контейнерам, применяемым в процессе размножения клеток, могут включать поле, соответствующее различным моментам времени, и результат определения, выполненного в соответствующий момент времени, чтобы определить, соответствуют ли параметры приемлемости размноженного продукта клеточной терапии определенным критериям приемлемости.

Таким образом, на любом этапе процесса этикетка предоставляет информацию о пациенте (посредством специфичного для пациента идентификатора), что позволяет поддерживать цепочку идентификации и цепочку ответственности. Этикетка также может предоставлять информацию о различных этапах обработки, которым подвергся связанный с ней биологический материал, обеспечивая запись цепочки

ответственности, а также историю событий, например, для целей аудита.

Таким образом, система 300 может быть выполнена с возможностью поддержания COI и COC на протяжении всего процесса производства продукта клеточной терапии и цепочки поставок. Кроме того, система 300 может быть выполнена с возможностью включения средств защиты, соответствующих требованиям 21 CFR Часть 11, HIPAA (закон о переносимости и подотчетности медицинского страхования) и GDPR (Общий регламент ЕС по защите данных), а также обеспечения безопасности и защиты данных.

Чтобы ограничивать доступ к конфиденциальным данным, система 300 реализует роли и доступ на основе пользователей в некоторых вариантах осуществления. В некоторых вариантах осуществления метка времени может быть включена в этикетку во время ее генерирования.

В некоторых вариантах осуществления идентификатор заказа клеток, отслеживаемый модулем отслеживания, может дополнительно включать в себя знаки или поля, связанные, например, с различными событиями доставки/транспортировки, различными событиями производственного процесса и/или различными этапами схемы лечения. Эти знаки или поля могут быть не напечатаны на этикетке, а сгенерированы или добавлены модулем отслеживания для отслеживания биологического материала, связанного с пациентом, а также для отслеживания хода выполнения терапии. В таких вариантах осуществления метка времени, указывающая время завершения определенного этапа, может быть связана с идентификатором заказа клеток или добавлена к нему на каждом этапе, где данный индекс или поле изменяются или обновляются. Следует понимать, что информация, включенная в такой обновленный идентификатор заказа клеток, может также применяться для динамического изменения расписания лечебных событий пациента, как подробно описано в других разделах настоящего документа.

1. Маркировка продукта клеточной терапии в процессе производства.

Как показано на фиг. 3F, в некоторых вариантах осуществления идентификатор заказа клеток напечатан на читаемых этикетках и связан со штрих-кодами или QR-кодами (или 2D-кодами), чтобы обеспечить адекватную проверку идентификации от резекции опухоли до инфузии аутологичного лекарственного препарата. Этикетка может быть нанесена на объекты, связанные с биологическим материалом, а также со схемой лечения. Например, этикетка, содержащая специфичный для пациента идентификатор, может быть прикреплена к контейнеру, в котором перевозится резецированная опухоль из больницы или клинического учреждения на предприятие по производству TIL, оборудованию для производства TIL и контейнерам для TIL на различных этапах производства, транспортировочному контейнеру для транспортировки размноженных TIL обратно в больницу или клиническое учреждение, оборудованию, связанному с различными лечебными событиями, или любой их комбинации.

Например, в некоторых вариантах реализации пациент может войти в систему через модуль 116 доступа пациента интерфейса 110 на стороне больницы и зарегистрироваться. После регистрации и сбора в системе отслеживаемой информации о пациенте система может назначить пациенту специфичный для пациента идентификатор (номер COI). Назначение специфичного для пациента идентификатора позволяет запланировать дату резекции и производственный интервал.

Планирование производственного интервала в системе инициирует генерирование заказа клеток и присвоение номера партии на производственном объекте.

До резекции опухоли клиническое учреждение может получить доступ к системе, подтвердить правильную идентификацию пациента и сгенерировать этикетку флакона для опухоли и этикетку отправителя опухоли. Этикетка может включать специфичный для пациента идентификатор в дополнение к идентификатору заказа клеток. В некоторых вариантах осуществления специфичный для пациента идентификатор может представлять собой поле в идентификаторе заказа клеток.

После резекции опухоли в модуле 112 отслеживания инициируется цепочка ответственности. Флакон для опухоли с этикеткой затем можно поместить в транспортное средство и передать курьеру для транспортировки на производственный объект. Цепочка ответственности продолжается по мере того, как курьер проверяет, совпадает ли номер заказа клеток на этикетке отправителя с номером заказа клеток в заказе доставки в системе курьера, которая интегрирована в систему 300, тем самым обеспечивая отслеживание опухоли в режиме реального времени между лечебным центром и производственным объектом.

После доставки опухоли на производственный объект в системе может быть сгенерировано подтверждение доставки. После получения опухоли производственный персонал вводит номер производственной партии в систему в производственном модуле 140 через модуль 144 COC/COI. При извлечении медицинской карточки пациента (доступной через модуль 118 координации производства) этикетка флакона для опухоли сканируется в систему, чтобы убедиться, что специфичный для пациента идентификатор связан с номером производственной партии. После проверки COC передается на производственный объект.

Персонал производственного предприятия может войти в систему, при этом модуль 142 маркировки позволяет генерировать этикетки незавершенного производства (WIP), которые содержат запрос на заказ клеток. Чтобы облегчить аудит записей постфактум, этикетки WIP могут быть прикреплены к записи о партии и колбе для выращивания клеток. На фиг. 3G представлено репрезентативное изображение этикетки WIP в соответствии с вариантом осуществления. На фиг. 3H показаны различные типы этикеток WIP и информация, включенная в каждый тип этикетки, в соответствии с вариантом осуществления.

Затем производственный персонал может сканировать этикетки в ключевых точках перехода во время производственного процесса, чтобы убедиться, что номер идентификатора заказа клеток на колбе для выращивания клеток соответствует записи о партии, обеспечивая поддержание COI на протяжении всего производственного процесса.

Кроме того, каждый образец контроля качества (QC) будет иметь собственную этикетку с номером COI, чтобы гарантировать, что полученные результаты затем будут связаны с соответствующей записью о партии. По завершении производственного процесса модуль 142 маркировки может генерировать этикетки готового продукта. На фиг. 3I и 3J представлены примеры этикетки готового продукта.

Как показано на фиг. 3I-3J, эти этикетки готового продукта содержат уникальную идентификацию пациента, включая имя 354, дату 356 рождения (DOB) и специфичный для пациента 352 идентификатор. Этикетки готового продукта прикрепляют к конечному продукту, а запись о партии и этикетки сканируют, чтобы обеспечить COI и полную цепочку ответственности на производственном предприятии.

Готовый продукт передают грузоотправителю с тем же идентификатором заказа клеток, включая соответствующий специфичный для пациента идентификатор, проверяют и передают курьеру для доставки в лечебный центр для инфузии. Затем курьер может проверить, совпадают ли идентификатор заказа клеток и специфичный для пациента идентификатор на транспортном контейнере с информацией о заказе клеток и пациенте в системе курьера, полученной через логистический интерфейс 130, тем самым обеспечивая отслеживание каждой партии лекарственного препарата в режиме, близком к реальному времени, между производственным объектом и лечебным центром. При этом COC передается от производственного объекта курьеру.

Курьер доставляет готовый продукт в лечебный центр для инфузии в организм пациента. Курьер может инициировать подтверждение доставки (POD) через логистический интерфейс 130, и COC передается от курьера лечебному центру. COI заканчивается инфузией продукта в организм пациента в лечебном центре.

Как описано в настоящем документе, передача специфичного для пациента идентификатора между интерфейсом 110 на стороне больницы, планировщиком 120 событий, производственным порталом 140 и логистическим интерфейсом 130 после каждого этапа обработки гарантирует, что все вовлеченные стороны (например, клиническое учреждение, производственное предприятие и поставщик логистических услуг) получают запись о цепочке ответственности, а также цепочке идентификации биологического материала, а также получают запись о различных этапах процесса, через которые прошел биологический материал.

Специфичный для пациента идентификатор и запрос на заказ клеток, предоставляемые для солидной опухоли с помощью этикетки, таким образом, позволяют отслеживать доставку, чтобы поддерживать цепочку ответственности и цепочку идентификации, которые необходимы для безопасности пациента, а также для соблюдения нормативных требований (например, аудиты FDA).

2. Сверка этикеток в случае изменения производственного процесса.

После приема солидной опухоли на производственном предприятии начинается производство продукта клеточной терапии в соответствии с запросом на заказ клеток. Например, по меньшей мере часть солидной опухоли может быть применена для производства продукта клеточной терапии с помощью методики размножения клеток.

В некоторых вариантах осуществления компьютерная подсистема, связанная с производственным предприятием, например, модуль 142 маркировки, может вызывать печать второй этикетки, связанной с частью солидной опухоли, применяемой для размножения клеток. Вторая этикетка может включать в себя специфичный для пациента идентификатор и идентификатор запроса клеток. Вторая этикетка также позволяет отслеживать продукт клеточной терапии для поддержания цепочки ответственности и цепочки идентификации.

Затем во время производства продукта клеточной терапии определяют параметры приемлемости изготовленного продукта клеточной терапии в различные моменты времени. Затем параметры приемлемости сравнивают в модуле 123 определения приемлемости, чтобы определить, соответствуют ли параметры приемлемости, определенные в конкретный момент времени, критериям приемлемости в соответствующий момент времени. Параметры приемлемости могут быть определены любым подходящим способом или процессом, описанным в настоящем документе. Кроме того, критериями приемлемости могут быть любые описанные в настоящем документе критерии приемлемости.

В некоторых вариантах осуществления результат определения параметров приемлемости и того, соответствуют ли параметры приемлемости критериям приемлемости, могут быть добавлены к идентификатору заказа клеток, как описано в других разделах настоящего документа. В некоторых вариантах осуществления третья этикетка может быть сгенерирована на основе результата определения того, соответствуют (или не соответствуют) ли параметры приемлемости критериям приемлемости.

Например, если параметры приемлемости во второй момент времени не соответствуют критериям приемлемости во второй момент времени, для контейнера, применяемого в процессе производства, генерируется третья этикетка, включающая "код причины", чтобы передать информацию о том, что параметры приемлемости во второй момент времени не соответствуют критериям приемлемости во второй мо-

мент времени и почему критерии приемлемости во второй момент времени не выполняются.

Кроме того, если установлено, что продукт клеточной терапии, полученный во второй момент времени, может быть повторно обработан из первого момента времени, предшествующего второму моменту времени, для надлежащего получения продукта клеточной терапии, который соответствует критериям приемлемости во второй момент времени, третья этикетка может включать информацию, такую как, например, новый или обновленный идентификатор запроса клеток, как описано в других разделах настоящего документа. В таких случаях третья этикетка может дополнительно включать "код причины" для передачи информации, касающейся критериев приемлемости во второй момент времени и того, почему было уместно повторно обрабатывать продукт клеточной терапии с первого момента времени.

Далее, в зависимости от того, соблюдаются ли критерии приемлемости в один или более моментов времени, как определено в модуле 123 определения приемлемости, производственное расписание производства продукта клеточной терапии соответствующим образом модифицируется для генерирования обновленного производственного расписания, как описано в других разделах настоящего документа. Кроме того, наличие производственных интервалов на производственном предприятии также соответствующим образом модифицируется, чтобы отразить изменения, если таковые имеются, в текущем расписании производства продукта клеточной терапии. Измененная или обновленная доступность производственных интервалов на этом производственном предприятии затем может быть передана в вычислительное устройство. Кроме того, предварительное расписание лечебных событий пациента также может быть изменено на основе обновленного производственного расписания, и обновленное расписание лечебных событий пациента может быть передано в вычислительное устройство.

Затем производство продукта клеточной терапии завершается в соответствии с обновленным производственным расписанием.

В некоторых вариантах осуществления генерируется производственная этикетка, соответствующая каждому из множества моментов времени, в которые определяются параметры приемлемости. Производственная этикетка в каждый момент времени может включать обновленную информацию, связанную с качеством производимого продукта клеточной терапии. Обновленная информация может включать параметры приемлемости в соответствующий момент времени и/или данные о том, соответствуют ли параметры приемлемости критериям приемлемости в данный момент времени.

Кроме того, в некоторых вариантах осуществления контроллер, управляющий производственным процессом, может быть выполнен с возможностью считывания обновленной производственной этикетки и определения последующего этапа обработки. Например, если обновленная производственная этикетка после проверки качества во второй момент времени указывает на то, что продукт клеточной терапии не соответствует определенным критериям приемлемости, но продукт клеточной терапии может быть повторно обработан с первого момента времени, контролер может внести соответствующие изменения в производственный процесс. Кроме того, на основе информации на обновленной этикетке также вносятся соответствующие изменения в производственное расписание, доступность производственных интервалов и расписание лечебных событий пациента. Специалистам в данной области техники будет понятно, что обновленная производственная этикетка может включать идентификатор заказа клеток и специфичный для пациента идентификатор в дополнение к информации, относящейся к качеству производимого продукта клеточной терапии, и код причины для облегчения поддержания цепочки идентификации и цепочки ответственности.

Специалистам в данной области техники также будет понятно, что информация, относящаяся к изменениям в расписании производства, доступности производственных интервалов и расписанию лечебных событий пациента, полученная в результате считывания обновленных производственных этикеток, может быть передана в интерфейс на стороне больницы и логистический интерфейс, чтобы позволить соответствующим вычислительным устройствам внести соответствующие изменения в соответствующие расписания, связанные с этими объектами.

D. Координация производства продукта клеточной терапии с лечебными событиями пациента.

На фиг. 4A и 4B показана блок-схема способа координации производства TIL для пациента в соответствии с вариантом осуществления настоящего изобретения. В некоторых вариантах осуществления способ, показанный на фиг. 4A и 4B, реализуется в системе в целом, изображенной на фиг. 3A, причем в некоторых вариантах осуществления способ, показанный на фиг. 4A и 4B, реализуется посредством частей системы, изображенной на фиг. 3A. В некоторых вариантах осуществления планировщик 120 событий получает, например, на этапе S305, запрос на заказ клеток для размножения продукта клеточной терапии, например, Т-клеток, для пациента из интерфейса 110 на стороне больницы, и специфичный для пациента идентификатор, связанный с запросом заказа клеток.

В некоторых вариантах осуществления специфичный для пациента идентификатор или, альтернативно, идентификатор заказа клеток генерируется планировщиком 120 событий, например, на этапе S310, а не модулем 112 отслеживания.

Запрос на заказ клеток может включать в себя информацию, такую как, например, информацию, идентифицирующую пациента, целевые даты для различных лечебных событий пациента и/или целевые параметры для конечного размноженного продукта TIL. После приема запроса на заказ клеток плани-

ровщик 120 событий может передать подтверждение интерфейсу 110 на стороне больницы, указывающее на то, что запрос на заказ клеток, соответствующий специфичному для пациента идентификатору, был принят. В вариантах осуществления, в которых специфичный для пациента идентификатор генерируется планировщиком 120 событий, планировщик 120 событий может передать подтверждение, указывающее на то, что запрос на заказ клеток для пациента был принят, и предоставить специфичный для пациента идентификатор или идентификатор заказа клеток в интерфейс 110 на стороне больницы. Кроме того, планировщик 120 событий может передать целевое расписание лечебных событий пациента на основе полученного запроса на заказ клеток.

Кроме того, планировщик 120 событий может передать запрос инициации, включающий специфичный для пациента идентификатор, например на этапе S315, в интерфейс 110 на стороне больницы, например, в клиническое учреждение, для выполнения процедуры на пациенте для получения солидной опухоли от пациента и планирования времени доставки курьером полученной солидной опухоли на производственное предприятие. Как описано в данном документе, процедура может включать, помимо прочего, биопсию опухоли для извлечения части опухоли из организма пациента. В некоторых вариантах осуществления планировщик 120 событий может принимать дату процедуры от сотрудника с помощью интерфейса 110 на стороне больницы. В ответ планировщик 120 событий может предложить сотруднику заказать расходные материалы (например, набор для резекции опухоли, контейнер для транспортировки опухоли или контейнер для криотранспортировки) по мере необходимости и связать их со специфичным для пациента идентификатором.

После выполнения процедуры получения солидной опухоли и отправки солидной опухоли, например, на этапе S320, и после приема полученной солидной опухоли на производственном предприятии модуль 125 планирования динамически планирует, например, на этапе S325, различные производственные события, а также различные лечебные события пациента и связывает каждое событие со специфичным для пациента идентификатором. В некоторых вариантах осуществления модуль 125 планирования определяет расписание производственных событий и лечебных событий пациента до приема полученной солидной опухоли, например, после приема информации о планировании процедуры получения солидной опухоли от пациента из интерфейса 110 на стороне больницы, и связывает каждое событие со специфичным для пациента идентификатором.

Расписание различных производственных событий связано со специфичным для пациента идентификатором и может включать соответствующие целевые даты, в которые выполняются различные производственные этапы (например, этапы A-F, показанные на фиг. 2A, 2B или 2C и/или 9), а также соответствующую целевую дату завершения процесса производства TIL. Как описано в настоящем документе, целевые сроки для различных производственных этапов могут зависеть от таких факторов, как размер полученной опухоли, количество клеток до начала данного этапа, числовая кратность в конце данного этапа, количество дней, необходимых для достижения определенной числовой кратности на данном этапе и/или другие факторы.

Расписание различных лечебных событий пациента может включать целевые даты для различных лечебных событий пациента, связанных со специфичным для пациента идентификатором, такие как, например, целевая дата инфузии TIL, дата лимфодеплеции, продолжительность пребывания в стационаре, расписание для схемы инфузии IL-2 и/или другие подобные даты, связанные с лечением. Как описано в настоящем документе, расписание лечебных событий пациента зависит от расписания производственных событий и, в частности, от даты завершения производства TIL. В некоторых вариантах осуществления расписание различных лечебных событий пациента может быть передано в интерфейс 110 на стороне больницы вместе со специфичным для пациента идентификатором.

Модуль 125 планирования выполнен с возможностью динамического изменения расписания производственных событий, а также расписания лечебных событий пациента на основе хода выполнения и успеха различных производственных этапов. Например, в зависимости от того, соответствуют ли параметры приемлемости, связанные с размноженным продуктом клеточной терапии на разных этапах, определенным критериям приемлемости, необходимо изменить даты начала последующих этапов производства, что, в свою очередь, изменяет целевую дату завершения, и как следствие, даты лечебных событий пациента должны быть изменены с помощью, например, способов, изображенных на фиг. 4B или 4C.

Модуль 123 определения приемлемости определяет, соответствуют ли параметры приемлемости, связанные размноженным продуктом клеточной терапии, определенным критериям приемлемости. Параметры приемлемости включают, помимо прочего, количество клеток, жизнеспособность клеток, стерильность, количество микоплазм, количество CD3, количество CD5, продукцию интерферона-γ (INF-γ), результат анализа эндотоксина, результат анализа окрашивания по Граму и т.д. Некоторые или все из этих параметров приемлемости могут нуждаться в соответствии критериям приемлемости в зависимости от этапа, на котором измеряются параметры приемлемости. Например, в конце первого инициирующего размножения (также называемого в настоящем документе первым моментом времени), например, через 11 дней после начала размножения, критерием приемлемости может быть то, что количество жизнеспособных клеток должно составлять не менее 5×10^6. Критерии приемлемости на разных этапах также зави-

сят от процесса (например, Gen 2, Gen 3, Gen 3.1 и т.д.), применяемого для выполнения размножения.

Таким образом, модуль 123 определения приемлемости может определить, соответствуют ли параметры приемлемости определенным критериям приемлемости в более чем один разный момент времени после инициирования размножения в зависимости от процесса, применяемого для выполнения размножения. Другими словами, модуль 123 определения приемлемости выполняет тест качества, также называемый в настоящем документе проверкой качества, в каждый из различных заданных моментов времени для определения последующего плана действий, а модуль 125 планирования динамически планирует последующие производственные этапы и лечебные события пациента на основе результатов проверки качества, полученных от модуля 123 определения приемлемости.

Один пример параметров приемлемости и критериев приемлемости для тестирования конечного продукта для процесса Gen 2, подобного Gen 2 и Gen 3 приведен в табл. B.

Таблица B

Тип теста (параметр приемлемости)	**Способ**	**Критерий приемлемости**
Контроль готовой продукции		
Жизнеспособность клеток	Флуоресценция	не менее 70%
Общее количество жизнеспособных клеток	Флуоресценция	от 1e9 до 150e9
Идентичность (%CD45+/CD3+)	Проточная цитометрия	Подобный Gen 2: не менее 90% CD45+CD3+ TIL для не яичников Gen 3: не менее 90% CD45+CD3+ TIL для не яичников не менее 85% CD45+CD3+ TIL для яичников
Производство гамма-интерферона (стимулированное - нестимулированное)	Стимуляция и ELISA	более 500 пг/мл

Ссылаясь на фиг. 4B, в одном варианте осуществления после инициирования размножения продукта клеточной терапии модуль 123 определения приемлемости определяет, например, на этапе S402, прошел ли размноженный продукт клеточной терапии в первый момент времени проверку качества, связанную с первым моментом времени (например, после этапа B, показанного на фиг. 2A и/или 9). После определения того, что элементы не прошли проверку качества в первый момент времени, например, на этапе S404, модуль 123 определения приемлемости определяет, не прошли ли элементы проверку качества из-за загрязнения. Если клетки не прошли проверку качества из-за загрязнения, случай рассматривается на предмет возможного прекращения, например, на этапе S422.

С другой стороны, если клетки не прошли проверку качества по причинам, отличным от загрязнения, например, из-за низкого количества клеток или низкой жизнеспособности, модуль 125 планирования может продлить текущий этап на время в зависимости от причин, из-за которых клетки не прошли проверку качества, и пересмотреть результаты окончательного сбора клеток, например, на этапе S408. В некоторых вариантах осуществления все последующие производственные этапы и лечебные события пациента могут быть повторно спланированы вследствие продления текущего этапа на некоторое время.

В качестве альтернативы, модуль 125 планирования может изменить расписание только лечебных событий пациента так, чтобы учесть возможную задержку завершения производственного процесса или учесть возможную криогенную заморозку изготовленного продукта клеточной терапии, чтобы предусмотреть временную задержку между завершением производства и инфузией продукта клеточной терапии. Следует понимать, что в некоторых вариантах осуществления продукт клеточной терапии содержит Т-клетки пациента. В некоторых вариантах осуществления продукт клеточной терапии содержит инфильтрирующие опухоль лимфоциты (TIL). Таким образом, описание в настоящем документе может для

простоты относиться к продукту клеточной терапии взаимозаменяемо как к Т-клеткам или TIL.

Например, в некоторых случаях продукт клеточной терапии может пройти окончательную проверку качества, несмотря на то, что он не прошел проверку качества в первый момент времени. В таких случаях может быть разумным отклониться от оптимального расписания производственных событий и лечебных событий пациента и отложить лимфодеплецию до проведения окончательной проверки качества, чтобы избежать ненужного лечения пациента. Таким образом, в зависимости от причин, по которым клетки не прошли проверку качества в первый момент времени, на этапе S418 определяется, должно ли расписание лечебных событий пациента отклоняться от оптимального расписания лечебных событий пациента. После определения того, что расписание лечебных событий пациента должно отклоняться от оптимального расписания, модуль 125 планирования может изменить расписание (т.е. отложить), например, на этапе S420, лимфодеплеции, а также последующих лечебных событий пациента, и дополнительно необязательно запланировать этап криогенной заморозки после завершения производственного процесса.

Возвращаясь к этапу S402, если клетки проходят проверку качества в первый момент времени, может не потребоваться никаких изменений в расписании производственного процесса или лечебных событий пациента. Затем модуль 123 определения приемлемости определяет, например, на этапе S406, проходят ли размноженные Т-клетки во второй момент времени проверку качества, связанную со вторым моментом времени (например, после этапа C или этапа D, показанных на фиг. 2A и/или 9).

Если клетки не проходят проверку качества во второй момент времени, модуль 123 определения приемлемости определяет, например, на этапе S404, не прошли ли клетки проверку качества из-за загрязнения. Если клетки не прошли проверку качества из-за загрязнения, случай рассматривается на предмет возможного прекращения, например, на этапе S422.

С другой стороны, если клетки не прошли проверку качества по причинам, отличным от загрязнения, например, из-за низкого количества клеток или низкой жизнеспособности, модуль 125 планирования может продлить текущий этап на время в зависимости от причин, из-за которых клетки не прошли проверку качества, и пересмотреть результаты окончательного сбора клеток, например, на этапе S408. В некоторых вариантах осуществления все последующие производственные этапы и лечебные события пациента могут быть повторно спланированы вследствие продления текущего этапа на некоторое время.

В качестве альтернативы, модуль 125 планирования может изменить расписание только лечебных событий пациента, чтобы учесть возможную задержку завершения производственного процесса или учесть возможную криогенную заморозку произведенных TIL, чтобы предусмотреть временную задержку между завершением производства и инфузией TIL.

Например, в некоторых случаях клетки могут пройти окончательную проверку качества, несмотря на то, что они не прошли проверку качества во второй момент времени. В таких случаях может быть разумным отклониться от оптимального заданного расписания (также называемого в настоящем документе "золотой серединой") лечебных событий пациента и отложить лимфодеплецию до проведения окончательной проверки качества, чтобы избежать ненужного лечения пациента. Таким образом, в зависимости от причин, по которым клетки не прошли проверку качества во второй момент времени, модуль планирования 125 может изменить расписание (т.е. отложить), например, на этапе S420, лимфодеплеции, а также последующих лечебных событий пациента, и дополнительно запланировать этап криогенной заморозки после завершения производственного процесса.

В некоторых вариантах осуществления, когда клетки не прошли проверку качества в первый или второй момент времени, специфичный для пациента идентификатор может быть обновлен, чтобы идентифицировать, что клетки не прошли проверку качества в соответствующий момент времени, и интерфейс 110 на стороне больницы и логистический интерфейс 130 уведомляются о том, что существует вероятность того, что лечебные события пациента (связанные со специфичным для пациента идентификатором), возможно, придется отменить или отложить. Если расписание лечебных событий пациента отклонился от заданного расписания (например, расписания "золотой середины") и расписание лечебных событий пациента было изменено, интерфейс 110 на стороне больницы и логистический интерфейс 130 уведомляются о том, что расписание, соответствующее специфичному для пациента идентификатору был обновлен, а обновленное расписание передается в интерфейс 110 на стороне больницы и логистический интерфейс 130.

Такое уведомление позволяет клиническому учреждению или больнице надлежащим образом корректировать различные расписания лечебных событий пациентов, а также принимать необходимые логистические меры, касающиеся наличия соответствующего персонала и наличия средств и оборудования, необходимых для соответствующих лечебных событий пациента. Уведомление может дополнительно облегчить больнице или клиническому учреждению информирование пациента об изменении расписания лечебных событий пациента. В качестве альтернативы, планировщик 120 событий и/или интерфейс 110 на стороне больницы могут связываться с пациентом напрямую, чтобы уведомить пациента об изменении в расписании лечебных событий пациента и позволить пациенту координировать свои действия с больницей или клиническим учреждением для организации лечебных событий пациента согласно измененному расписанию.

В некоторых вариантах осуществления интерфейс 110 на стороне больницы может дополнительно

сообщать обновленное расписание поставщику страховых услуг, чтобы можно было принять соответствующие меры для обработки платежа.

Аналогичным образом, уведомление позволяет поставщику(ам) логистических услуг принять необходимые меры для изменения расписания доставки биологического материала, такие как, например, размещение соответствующих упаковочных ящиков и обеспечение наличия соответствующего персонала для обработки биологического материала.

Возвращаясь к этапу S406, если клетки проходят проверку качества во второй момент времени, модуль 125 планирования может поддерживать расписание лечебных событий пациента. Например, в некоторых вариантах осуществления модуль 125 планирования может сообщать, например, на этапе S410, интерфейсу 110 на стороне больницы, что пациенту может быть назначено лечение лимфодеплеции на основе заданного расписания с оговоркой, что существует низкая, но ненулевая вероятность того, что производственный процесс еще может быть отложен или может не дать желаемого конечного продукта. Такая связь обозначена на фиг. 4B как "лимфодеплеция под угрозой". Никаких изменений в расписание производственного процесса или лечебных событий пациента в такой ситуации не вносится.

Затем модуль 123 определения приемлемости определяет, например, на этапе S412, проходят ли размноженные Т-клетки в третий момент времени проверку качества, связанную с третьим моментом времени (например, после этапа D или этапа E, показанных на фиг. 2A и/или 9).

Если клетки проходят проверку качества в третий момент времени, размноженные клетки считаются готовыми к выпуску продукта в целевую дату инфузии TIL. В таких случаях модуль 125 планирования уведомляет, например, на этапе S424, интерфейс 110 на стороне больницы о том, что лечебные события пациента должны продолжаться по целевому расписанию. Другими словами, никаких изменений в расписание не вносится.

С другой стороны, если клетки не проходят проверку качества в третий момент времени, выполняется оценка воздействия продукта (например, врачом или главным медицинским работником, проводящим лечение), например, на этапе S414, чтобы определить, действительно ли размноженные клетки могут быть предоставлены для инфузии или лечение должно быть прекращено в зависимости от причин, по которым клетки не прошли проверку качества в третий момент времени. Если после оценки воздействия продукта определено, например, на этапе S416, что лечение может быть продолжено с оговоркой, что может существовать определенный риск, связанный с продолжением лечения доступным продуктом, размноженные клетки утверждаются для выпуска, например, на этапе S424 без каких-либо изменений в расписании лечебных событий пациента.

Ссылаясь на фиг. 4C, в одном варианте осуществления после инициирования размножения продукта клеточной терапии модуль 123 определения приемлемости определяет, например, на этапе S402, прошел ли размноженный продукт клеточной терапии в первый момент времени проверку качества, связанную с первым моментом времени (например, после этапа B, показанного на фиг. 2A и/или 9). После определения того, что элементы не прошли проверку качества в первый момент времени, например, на этапе S404, модуль 123 определения приемлемости определяет, не прошли ли элементы проверку качества из-за загрязнения. Если клетки не прошли проверку качества из-за загрязнения, случай рассматривается на предмет возможного прекращения, например, на этапе S422.

С другой стороны, если клетки не прошли проверку качества по причинам, отличным от загрязнения, например, из-за низкого количества клеток или низкой жизнеспособности, модуль 125 планирования может продлить текущий этап на время в зависимости от причин, из-за которых клетки не прошли проверку качества, и пересмотреть результаты окончательного сбора клеток, например, на этапе S408. В некоторых вариантах осуществления все последующие производственные этапы и лечебные события пациента могут быть повторно спланированы вследствие продления текущего этапа на некоторое время.

Возвращаясь к этапу S402, если клетки проходят проверку качества в первый момент времени, никакие изменения на вносятся в расписание производственного процесса или лечебных событий пациента. Затем модуль 123 определения приемлемости определяет, например, на этапе S406, проходят ли размноженные Т-клетки во второй момент времени проверку качества, связанную со вторым моментом времени (например, после этапа C или этапа D, показанных на фиг. 2A и/или 9).

Если клетки не проходят проверку качества во второй момент времени, модуль 123 определения приемлемости определяет, например, на этапе S404', не прошли ли клетки проверку качества из-за загрязнения. Если клетки не прошли проверку качества из-за загрязнения, случай рассматривается на предмет возможного прекращения, например, на этапе S422.

С другой стороны, если клетки не прошли проверку качества по причинам, отличным от загрязнения, например, из-за низкого количества клеток или низкой жизнеспособности, модуль 123 определения приемлемости определяет, например, на этапе S458, имеет ли продукт клеточной терапии, полученный во второй момент времени, достаточное качество, чтобы сделать возможным повторное выполнение процесса производства клеток с первого момента времени, чтобы получить продукт клеточной терапии во второй момент времени с параметрами приемлемости, которые соответствуют критериям приемлемости во второй момент времени. Такое определение может быть сделано на основе параметров приемлемости продукта клеточной терапии, полученного во второй момент времени. Например, если параметры

приемлемости во второй момент времени соответствуют всем критериям приемлемости во второй момент времени, за исключением общего количества жизнеспособных клеток, может оказаться целесообразным повторно выполнить процесс производства клеток между первым и вторым моментами времени, чтобы получить необходимое количество жизнеспособных клеток.

Если определено, что повторное выполнение процесса производства клеток с первого момента времени нецелесообразно, случай рассматривается на предмет возможного прекращения, например, на этапе S422.

С другой стороны, если определено, что повторное выполнение процесса производства клеток между первым и вторым моментами времени целесообразно, модуль 125 планирования оценивает время завершения процесса производства клеток после повторного выполнения процесса между первым и вторым моментами времени, например, на этапе S460. Следует понимать, что время, необходимое для повторного выполнения процесса производства клеток между первым и вторым моментами времени, может быть оценено на основании параметров приемлемости продукта клеточной терапии, полученного во второй момент времени. Таким образом, время, необходимое для завершения процесса размножения клеток, включая повторное выполнение процесса с первого момента времени, для производства продукта клеточной терапии, может зависеть от параметров приемлемости продукта клеточной терапии, полученного во второй момент времени.

Затем модуль 125 планирования может изменить расписание всех последующих этапов производства и лечебных событий пациента вследствие повторного выполнения процесса производства клеток с первого момента времени на основе параметров приемлемости продукта клеточной терапии, полученного во второй момент времени. Например, модуль 125 планирования может изменить расписание лечебных событий пациента так, чтобы учесть задержку завершения производственного процесса или учесть возможную криогенную заморозку произведенных TIL, чтобы предусмотреть временную задержку между завершением производства и инфузией TIL.

С другой стороны, если параметры приемлемости продукта клеточной терапии, полученного во второй момент времени, соответствуют всем критериям приемлемости, процесс производства клеток может быть продолжен в соответствии с первоначальным расписанием.

Специалистам в данной области техники будет понятно, что даже после повторного выполнения процесса производства клеток с первого момента времени при определении того, что такое повторное выполнение целесообразно, определяют параметры приемлемости продукта клеточной терапии, полученного в повторный второй момент времени (также называемый в настоящем документе как альтернативный второй момент времени). Затем снова определяют, соответствуют ли параметры приемлемости в повторный второй момент времени (который может отличаться от первоначального второго момента времени в процессе производства клеток) критериям приемлемости второго момента времени до продолжения процесса производства клеток после второго момента времени.

Затем продолжающийся процесс идет по тому же пути "B", что и показанный на фиг. 4B в некоторых вариантах осуществления. Например, в некоторых случаях клетки могут пройти окончательную проверку качества, несмотря на то, что они не прошли проверку качества во второй момент времени. В таких случаях может быть разумным отклониться от оптимального заданного расписания (также называемого в настоящем документе "золотой серединой") лечебных событий пациента и отложить лимфодеплецию до проведения окончательной проверки качества, чтобы избежать ненужного лечения пациента. Таким образом, в зависимости от причин, по которым клетки не прошли проверку качества во второй момент времени, модуль планирования 125 может изменить расписание (т.е. отложить), например, на этапе S420, лимфодеплеции, а также последующих лечебных событий пациента, и дополнительно запланировать этап криогенной заморозки после завершения производственного процесса.

Специалистам в данной области техники будет понятно, что, когда процесс производства клеток имеет несколько моментов времени для определения параметров приемлемости и того, соответствуют ли эти параметры приемлемости критериям приемлемости в эти соответствующие моменты времени, может оказаться целесообразным повторно выполнить этапы процесса производства клеток с непосредственно предшествующего момента времени. Таким образом, термины "первый момент времени" и "второй момент времени" не обязательно описывают численно первый и численно второй моменты времени, в которых определяются параметры приемлемости. Вместо этого "первый момент времени" относится к моменту времени в процессе производства клеток, начиная с которого может быть целесообразным повторное выполнение этапов процесса производства клеток, если параметры приемлемости в последующий момент времени не соответствуют критериям приемлемости в тот момент времени. Например, в процессе 1C (см. фиг. 6), первым и вторым моментами времени могут быть день 27 и день 30 соответственно, день 30 и день 36 соответственно или день 36 и день 43 соответственно. Аналогичным образом, в процессе 2A (см. фиг. 6), первым и вторым моментами времени могут быть день 11 и день 16 соответственно или день 16 и день 22 соответственно.

В некоторых вариантах осуществления, когда клетки не прошли проверку качества в первый или второй момент времени, специфичный для пациента идентификатор может быть обновлен, чтобы идентифицировать, что клетки не прошли проверку качества в соответствующий момент времени, и интер-

фейс 110 на стороне больницы и логистический интерфейс 130 уведомляются о том, что существует вероятность того, что лечебные события пациента (связанные со специфичным для пациента идентификатором), возможно, придется отменить или отложить.

Поскольку расписание производства продукта клеточной терапии может отклоняться от оптимального расписания, если повторное выполнение процесса производства клеток в первый момент времени целесообразно, расписание лечебных событий пациента также отклоняется от заданного расписания (например, расписания "золотой середины"). Соответственно, модуль планирования изменяет расписание лечебных событий пациента, а интерфейс 110 на стороне больницы и логистический интерфейс 130 уведомляются об обновлении расписания, соответствующего специфичному для пациента идентификатору. Обновленное расписание передается в интерфейс 110 на стороне больницы и логистический интерфейс 130.

Как описано в настоящем документе, такое уведомление об изменении расписания позволяет клиническому учреждению или больнице надлежащим образом корректировать различные расписания лечебных событий пациента. Кроме того, могут быть приняты необходимые логистические меры, касающиеся наличия соответствующего персонала и наличия средств и оборудования, необходимых для соответствующих лечебных событий пациента. Уведомление может дополнительно облегчить больнице или клиническому учреждению информирование пациента об изменении расписания лечебных событий пациента. В качестве альтернативы, планировщик 120 событий и/или интерфейс 110 на стороне больницы могут связываться с пациентом напрямую, чтобы уведомить пациента об изменении в расписании лечебных событий пациента и позволить пациенту координировать свои действия с больницей или клиническим учреждением для организации лечебных событий пациента согласно измененному расписанию.

В некоторых вариантах осуществления интерфейс 110 на стороне больницы может дополнительно сообщать обновленное расписание поставщику страховых услуг, чтобы можно было принять соответствующие меры для обработки платежа.

Аналогичным образом, уведомление позволяет поставщику(ам) логистических услуг принять необходимые меры для изменения расписания доставки биологического материала, такие как, например, размещение соответствующих упаковочных ящиков и обеспечение наличия соответствующего персонала для обработки биологического материала.

В некоторых вариантах осуществления, если лечение не прекращено, модуль 125 планирования связывается с логистическим интерфейсом 130, чтобы предоставить заказ на получение на основе даты завершения, определенной на основе результатов проверки качества в различные моменты времени. Затем логистический интерфейс 130 связывается с поставщиком логистических услуг (не показан), чтобы принять соответствующие меры для своевременного сбора и доставки размноженных TIL в больницу или клиническое учреждение для последующего лечения пациента (например, инфузии). Например, в некоторых вариантах осуществления поставщику логистических услуг может потребоваться отправить специализированный контейнер для транспортировки биологического образца в больницу или клиническое учреждение за определенное количество дней до запланированного лечебного события пациента.

Аналогичным образом, если определено, что размноженные клетки проходят проверку качества, модуль 125 планирования передает запланированную дату завершения и расписание лечебных событий пациента (т.е. обновленное расписание) в интерфейс 110 на стороне больницы. С другой стороны, если определено, что лечение должно быть прекращено, модуль 125 планирования сообщает интерфейсу 110 на стороне больницы, что лечение должно быть прекращено.

В некоторых вариантах осуществления при изменении расписания лечебных событий пациента обновленное расписание лечебных событий пациента передается в интерфейс 110 на стороне больницы вместе со связанным специфичным для пациента идентификатором.

В некоторых вариантах осуществления связь между идентификатором заказа клеток и специфичным для пациента идентификатором может быть обновлена, если определено, что повторное выполнение этапов процесса производства клеток с первого момента времени целесообразно. Например, после определения того, что повторное выполнение размножение продукта клеточной терапии с первого момента времени целесообразно, идентификатор заказа клеток отделяется от специфичного для пациента идентификатора. Может быть сгенерирован новый идентификатор заказа клеток, связанный с запросом на заказ клеток, при этом специфичный для пациента идентификатор связывается с новым идентификатором заказа клеток. В некоторых вариантах осуществления новый идентификатор заказа клеток может быть сгенерирован на основе параметров приемлемости, определенных во второй момент времени. Идентификатор заказа клеток в некоторых вариантах осуществления может включать поля, соответствующие каждому моменту времени, в который определяются параметры приемлемости продукта клеточной терапии. Кроме того, в некоторых вариантах осуществления идентификатор заказа клеток может также включать результат определения того, соответствуют ли параметры приемлемости критериям приемлемости, включая, например, то, какие параметры приемлемости соответствуют критериям приемлемости, и значение параметров приемлемости.

В некоторых вариантах осуществления специфичный для пациента идентификатор, новый идентификатор заказа клеток и расчетное время завершения размножения продукта клеточной терапии переда-

ются в интерфейс на стороне больницы, чтобы интерфейс на стороне больницы мог отслеживать продукт клеточной терапии и связать продукт клеточной терапии с пациентом.

Различные поля, включенные в идентификатор заказа клеток, могут позволить модулю 125 планирования определять новое расписание лечебных событий пациента, а также события доставки и логистики, связанные с лечебными событиями пациента, на основе обновленного или нового идентификатора заказа клеток, сгенерированного в различные моменты времени. Затем новое расписание передается в логистический интерфейс вместе с соответствующим специфичным для пациента идентификатором. В некоторых вариантах осуществления специфичный для пациента идентификатор и обновленный или новый идентификатор заказа клеток также могут быть переданы в логистический интерфейс вместе с новым расписанием, чтобы поддерживать цепочку ответственности и цепочку идентификации для продукта клеточной терапии.

В некоторых вариантах осуществления, если определено, что повторное выполнение этапов процесса производства клеток нецелесообразно, например, из-за того, что параметры приемлемости во второй момент времени не соответствуют определенному порогу для критериев приемлемости, последующее лечение пациента до второго момента времени может быть отменено. В таких вариантах осуществления информация об отмене лечения пациента передается в интерфейс на стороне больницы и логистический интерфейс. В некоторых вариантах осуществления размноженный продукт клеточной терапии может быть уничтожен при определении того, что повторное выполнение этапов процесса производства клеток нецелесообразно. Например, в случаях, когда получение жизнеспособного размноженного продукта клеточной терапии может оказаться невозможным, если этапы процесса производства клеток не могут быть выполнены повторно, инфузия продукта клеточной терапии становится невозможной. Таким образом, для пациента может быть вредным (например, либо с точки зрения последствий для здоровья, либо с точки зрения финансовых результатов, либо и того, и другого) продолжение лечебных событий пациента после второго момента времени. Кроме того, если на основе определенных параметров приемлемости во второй раз определено, что размноженный продукт клеточной терапии во второй момент времени не может применяться в дальнейшем (например, если продукт клеточной терапии во второй момент времени загрязнен или не соответствует некоторым другим критериям приемлемости), продукт клеточной терапии может быть уничтожен. В таких случаях идентификатор заказа клеток отделяется от специфичного для пациента идентификатора.

Е. Координация производственных интервалов между производственными предприятиями.

В еще одном аспекте настоящего изобретения описан способ производства продукта клеточной терапии для пациента. В некоторых вариантах осуществления способ включает прием запроса на заказ клеток для производства продукта клеточной терапии для пациента. Запрос на заказ клеток может быть принят в вычислительном устройстве, связанном с клиническим учреждением. Запрос на заказ клеток может быть принят, например, через интерфейс 110 на стороне больницы. В некоторых вариантах осуществления вычислительное устройство может генерировать специфичный для пациента идентификатор и идентификатор заказа клеток после приема запроса на заказ клеток и связывать специфичный для пациента идентификатор и идентификатор заказа клеток с запросом на заказ клеток.

В дополнение к запросу на заказ клеток вычислительное устройство может принимать информацию, касающуюся производственных интервалов на множестве производственных предприятий для производства продукта клеточной терапии. Например, вычислительное устройство может быть соединено с возможностью связи с компьютерными подсистемами, связанными со множеством производственных объектов, через, например, Интернет, так что вычислительное устройство может принимать информацию, относящуюся к производственным интервалам, в ответ на запрос вычислительного устройства. Производственные интервалы для соответствующего производственного предприятия могут указывать на наличие оборудования и персонала на этом производственном предприятии, чтобы позволить этому производственному предприятию производить продукт клеточной терапии в соответствии с запросом на заказ клеток.

Вычислительное устройство может дополнительно принимать предварительное расписание лечебных событий пациента для лечения пациента продуктом клеточной терапии. Предварительное расписание может быть определено на основе оптимального расписания производства продукта клеточной терапии, предполагая, что продукт клеточной терапии соответствует критериям обеспечения качества на каждом этапе производства в процессе производства, как описано в других разделах настоящего документа.

После приема запроса на заказ клеток, производственных интервалов и предварительного расписания лечебных событий пациента вычислительное устройство может определить и отобразить в пользовательском интерфейсе планирования множество доступных производственных интервалов для производства продукта клеточной терапии на основе предварительного расписания лечебных событий пациента. Доступные производственные интервалы определяются на основе таких факторов, как, например, расположение клинического учреждения, расположение соответствующих производственных предприятий, наличие поставщиков логистических услуг для доставки продукта клеточной терапии между соответствующим производственным предприятием и клиническим учреждением, наличие медицинского персо-

нала в клиническом учреждении для выполнения необходимых лечебных процедур, связанных с лечебными событиями пациента, и любые другие факторы, которые могут повлиять на время прибытия и/или применения продукта клеточной терапии в соответствующем месте.

Затем одна из доступных производственных интервалов выбирается либо оператором вычислительного устройства, либо автоматически вычислительным устройством. При выборе доступного производственного интервала солидную опухоль можно получить от пациента, например, в медицинском учреждении, выполнив соответствующую процедуру. Процедура может быть выполнена в соответствии с предварительным расписанием и на основе доступного производственного интервала с учетом сроков доставки и наличия поставщика логистических услуг для доставки солидной опухоли на соответствующее производственное предприятие. В некоторых вариантах осуществления вычислительное устройство может инициировать печать первой транспортной этикетки (см., например, строку 1 на фиг. 3H), связанной с солидной опухолью. Первая транспортная этикетка может включать специфичный для пациента идентификатор и идентификатор заказа клеток. В некоторых вариантах осуществления первая этикетка может дополнительно включать информацию, относящуюся к клиническому учреждению, выбранному производственному предприятию и поставщику логистических услуг. Кроме того, первая этикетка продукта (см., например, строку 2 на фиг. 3H) должна быть связана с контейнером для продукта. Пример первой этикетки продукта показан на фиг. 3G.

Затем солидную опухоль доставляют на выбранное производственное предприятие в соответствии с доступным производственным интервалом. Специалистам в данной области техники будет понятно, что, поскольку солидная опухоль включает живые клетки, время прибытия солидной опухоли на выбранное производственное предприятие должно быть тщательно скоординировано с наличием производственного интервала, чтобы производственные этапы могли быть начаты с приемлемым временным окном. Таким образом, доставка солидной опухоли от клинического учреждения на выбранное производство должна быть тщательно скоординирована с учетом доступности поставщика логистических услуг, а также других факторов, которые могут повлиять на такую доставку. Например, могут быть задержки, связанные с погодой или дорожным движением, которые можно ожидать в некоторых случаях, и, таким образом, расписание доставки может быть соответствующим образом скорректировано. В других случаях задержки при доставке могут быть непредсказуемыми. Однако даже в таких случаях доставка солидной опухоли от клинического учреждения на выбранное производственное предприятие можно координировать другими подходящими способами.

F. Протокол получения опухоли.

Как показано на фиг. 3A, интерфейс системы 300 на стороне больницы включает в себя модуль 114 получения опухоли, который позволяет персоналу клинического учреждения получать солидную опухоль от пациента в соответствии с заданным протоколом и вводить информацию, относящуюся к процедуре получения солидной опухоли от пациента.

В некоторых вариантах осуществления модуль 114 получения включает в себя формы для получения опухоли, которые применяются персоналом в клиническом учреждении для обеспечения соблюдения соответствующей процедуры в процессе получения солидной опухоли (или ее фрагмента) от пациента и подготовки ее к транспортировке на производственное предприятие. На фиг. 3K-3P представлены иллюстративные снимки экрана форм для получения опухоли в соответствии с некоторыми вариантами осуществления настоящего изобретения. Формы для получения опухоли могут, в некоторых вариантах осуществления, требовать, чтобы специалист, получающий опухоль от пациента, вводил информацию, относящуюся к выполняемой процедуре. Введенная информация может применяться для обновления записей о партиях для аудита постфактум, если это необходимо.

Кроме того, поскольку информация, включенная в записи о партиях, доступна во всей системе (с соответствующими разрешениями), информация, относящаяся к процессу получения опухоли, также доступна персоналу на производственном предприятии. В некоторых вариантах осуществления персонал на производственном предприятии может получить доступ к информации, относящейся к процессу получения опухоли, в качестве меры контроля качества, чтобы убедиться, что биологический материал, полученный на производственном предприятии, подходит для дальнейшей обработки.

В некоторых вариантах осуществления формы для получения опухоли включают в себя функции смарт-формы, которые требуют соблюдения определенных критериев, прежде чем специалист сможет перейти к следующему этапу процесса. Например, от специалиста может потребоваться ввести информацию, относящуюся к культуральным средам для клеток, такую как срок годности, применяемый во время процесса, и, если срок годности предшествует текущей дате, модуль 114 получения опухоли может предупредить специалиста. Кроме того, модуль 114 получения опухоли может запретить специалисту вводить какую-либо дополнительную информацию, относящуюся к процессу, тем самым вынуждая лаборанта прервать процесс.

Аналогичным образом формы для приобретения опухоли могут требовать, чтобы специалист выполнил определенные этапы или процедуры, прежде чем разрешить ввод информации, относящейся к последующему этапу или процедуре. Таким образом, модуль 114 получения требует, чтобы специалист следовал определенному протоколу, не упуская и не пропуская определенные этапы.

В некоторых вариантах осуществления модуль 114 получения может потребовать, чтобы формы для получения опухоли были проверены, прежде чем разрешить выдачу полученной опухоли курьеру для транспортировки на производственное предприятие. Требование проверки действует как отказоустойчивая система, обеспечивающая соблюдение соответствующих протоколов и процедур при получении опухоли. В некоторых вариантах осуществления модуль 114 получения может потребовать, чтобы лицо, проверяющее формы для получения опухоли, не совпадало с лицом, вводящим информацию в формы для получения опухоли. Такое требование проверки также обеспечивает соблюдение соответствующих нормативных требований.

G. Службы поддержки пациентов.

Варианты осуществления настоящего изобретения дополнительно обеспечивают возможность предоставления доступа к службам поддержки пациентов, которые взаимодействуют с пациентом или представителем пациента (далее совместно именуемые пациентом) в отношении поездок, управления здоровьем, медицинского страхования, возмещения расходов и других услуг, связанных с лечением. Службы поддержки пациентов могут, в некоторых вариантах осуществления, взаимодействовать с телефонным интерфейсом и профилем, из которого возможен доступ к производственному процессу и процессу COC/COI (с соответствующими разрешениями). В контексте настоящего документа термин "профиль" относится к типу пользователя. Данному профилю предоставляется определенный уровень доступа к системе и информации в системе, а также доступ к определенным функциям. Профили в системе включают, помимо прочего, представителя сообщества, специалиста по получению тканей, производителя, службу поддержки пациентов, пациента и пользователя системы здравоохранения.

Профиль "представитель сообщества" относится к пользователям сообщества и доступен персоналу центра, предоставляющему пациенту лечебные процедуры. Пользователи с профилем "представитель сообщества" могут включать, например, координаторов клеточной терапии, медсестер, занимающихся пересадкой костного мозга, работников отдела выставления больничных счетов и т.д. Функции, связанные с пользователями с профилем "представитель сообщества", включают, помимо прочего, регистрацию нового пациента, обновление данных о регистрации пациента, создание и отправку запроса на заказ TIL для пациента, планирование или изменение даты резекции, просмотр дат "золотой середины", просмотр конечных дат доставки продукта, загрузку заказов на получение для больниц, загрузку форм согласия пациентов, регистрацию пациента для получения вариантов поддержки пациента, просмотр и обновление записей о лицах, осуществляющих уход, заполнение и отправку форм для получения опухоли на утверждение, утверждение форм для получения опухоли, печать форм для получения опухоли, загрузку форм для получения опухолей, а также печать этикеток для флаконов для сред и транспортных этикеток для опухоли.

Пользователи, связанные с профилем "производитель", включают персонал, принимающий опухоль, персонал по контролю качества, персонал производственного процесса и персонал, занимающийся упаковкой конечного продукта. Функции, связанные с профилем "производитель" включают, помимо прочего, ввод номеров партий, просмотр доступных и зарезервированных производственных интервалов, печать и сканирование в процессе производства, этикетки для конечного продукта и транспортные этикетки.

Пользователи, связанные с профилем "специалист по получению опухоли", включают, например, хирургов и медсестер, занимающихся пересадкой костного мозга. Функции, связанные с профилем "специалист по получению опухоли", могут включать, помимо прочего, заполнение форм для получения опухоли, подачу форм для получения опухоли на утверждение, утверждение форм для получения опухоли, печать форм для получения опухоли и загрузку форм для получения опухоли.

Пользователи с профилем "служба поддержки пациентов" могут включать, помимо прочего, персонал службы поддержки пациентов, консультантов пациентов, работников отдела выставления больничных счетов, больничных менеджеров по страхованию и т.д. Функции, связанные с профилем "служба поддержки пациентов", могут включать, помимо прочего, просмотр обращений в службы помощи пациентам, загрузку файлов в обращения, аннотирование обращений, передачу обращений куратору и т.д.

В некоторых вариантах осуществления системы определенные типы информации доступны для определенных профилей. В некоторых вариантах осуществления информация может быть доступна пользователям с определенным профилем только при выполнении определенных типов функций, а не при выполнении других типов функций. Например, в некоторых вариантах осуществления информация о COC/COI и производственном процессе может быть доступна через профиль "служба поддержки пациентов" менеджерам отделов выставления больничных счетов и/или больничным менеджерам по страхованию, но не видна консультантам пациентов. В некоторых вариантах осуществления информация о производстве и COC/COI может быть видна, но недоступна для редактирования персоналу службы поддержки пациентов, который выполняет функции, например, планирования лечебных событий пациента, оказания помощи пациенту в процессе планирования и/или оказания помощи пациенту в транспортировке на лечебные события пациента.

Например, в некоторых вариантах осуществления способ производства продукта клеточной терапии путем размножения популяции клеток, полученных из опухоли пациента, в продукт клеточной терапии может включать

прием популяции клеток от пациента на производственном предприятии на основании запроса на заказ клеток для производства продукта клеточной терапии для пациента;

генерирование с помощью вычислительного устройства специфичного для пациента идентификатора, включающего идентификатор заказа клеток, связанный с запросом на заказ клеток;

инициирование процесса производства продукта клеточной терапии, включающего:

после приема популяции клеток на производственном объекте, планирование с помощью вычислительного устройства лечебных событий пациента,

инициирование размножения продукта клеточной терапии из по меньшей мере некоторой популяции клеток с помощью методики размножения клеток и определение параметров приемлемости размноженного продукта клеточной терапии в первый момент времени и во второй момент времени, следующий за первым моментом времени,

определение того, соответствуют ли параметры приемлемости размноженного продукта клеточной терапии критериям приемлемости, связанным с соответствующим моментом времени,

в ответ на определение того, что параметры приемлемости размноженного продукта клеточной терапии соответствуют критериям приемлемости в первый момент времени, продолжение размножения продукта клеточной терапии с по меньшей мере части полученного продукта клеточной терапии с помощью методики размножения клеток вплоть до второго момента времени, и

в ответ на определение того, что параметры приемлемости размноженного продукта клеточной терапии не соответствуют критериям приемлемости во второй момент времени:

определение возможности повторного выполнения размножения продукта клеточной терапии с помощью методики размножения клеток с первого момента времени на основании параметров приемлемости во второй момент времени,

в ответ на определение того, что повторное выполнение возможно, повторное выполнение размножения продукта клеточной терапии из по меньшей мере части продукта клеточной терапии, полученного во второй момент времени, с помощью методики размножения клеток с первого момента времени для получения продукта клеточной терапии,

оценку времени завершения размножения продукта клеточной терапии после повторного выполнения размножения продукта клеточной терапии с первого момента времени, и

изменение с помощью вычислительного устройства расписания лечебных событий пациента и завершение последующего размножения продукта клеточной терапии с первого момента времени,

причем изменение расписания лечебных событий пациента выполняют на основании расчетного времени завершения размножения продукта клеточной терапии и времени лечебных событий до или после инфузии размноженного продукта клеточной терапии в организм пациента, и

предоставление услуг поддержки пациентов, таких как, например, поддержка поездок, управление здоровьем, медицинское страхование, возмещение расходов и другие услуги, связанные с лечением.

VI. Дополнительные соображения.

Приведенные выше примеры предоставлены для того, чтобы предоставить специалистам в данной области техники полное раскрытие и описание того, как создавать и использовать варианты осуществления композиций, систем и способов по изобретению, и не предназначены для ограничения объема того, что изобретатели считают своим изобретением. Модификации вышеописанных способов осуществления изобретения, которые очевидны специалистам в данной области техники, входят в объем нижеприведенной формулы изобретения. Все патенты и публикации, упомянутые в описании, указывают на уровень квалификации специалистов в области техники, к которой относится изобретение.

Все заголовки и обозначения разделов применяются только для ясности и справочных целей и никоим образом не должны рассматриваться как ограничивающие. Например, специалисты в данной области техники оценят полезность объединения различных аспектов из разных заголовков и разделов в соответствии с сущностью и объемом изобретения, описанного в настоящем документе.

Все ссылки, процитированные в данном документе, тем самым включены в данный документе посредством ссылки во всей своей полноте и для всех целей в той же степени, как если бы каждая отдельная публикация, патент или патентная заявка была специально и индивидуально указаны для включения в качестве ссылки во всей своей полноте для всех целей.

Множество модификаций и вариаций по данной заявке могут быть выполнены без отклонения от ее сущности и объема, как будет очевидно специалистам в данной области техники. Описанные в настоящем документе конкретные варианты осуществления и примеры предлагаются только в качестве примера, а заявка должна быть ограничена формулировками прилагаемой формулы изобретения вместе с полным объемом эквивалентов, на которые распространяется такая формула изобретения.

Различные примеры аспектов изобретения описаны как пронумерованные пункты (1, 2, 3 и т.д.) для удобства. Они приведены в качестве примеров и не ограничивают рассматриваемую технологию. Обозначения фигур и ссылочных позиций приведены ниже только в качестве примеров и в иллюстративных целях, и пункты не ограничиваются этими обозначениями.

П.1. Способ производства продукта клеточной терапии путем размножения популяции клеток, полученных из опухоли пациента, в продукт клеточной терапии, причем способ включает

прием популяции клеток от пациента на производственном предприятии на основании запроса на заказ клеток для производства продукта клеточной терапии для пациента;

генерирование с помощью вычислительного устройства специфичного для пациента идентификатора, включающего идентификатор заказа клеток, связанный с запросом на заказ клеток;

инициирование процесса производства продукта клеточной терапии, включающего

после приема популяции клеток на производственном объекте, планирование с помощью вычислительного устройства лечебных событий пациента,

инициирование размножения продукта клеточной терапии из по меньшей мере некоторой популяции клеток с помощью методики размножения клеток и определение параметров приемлемости размноженного продукта клеточной терапии в первый момент времени и во второй момент времени, следующий за первым моментом времени,

определение того, соответствуют ли параметры приемлемости размноженного продукта клеточной терапии критериям приемлемости, связанным с соответствующим моментом времени,

в ответ на определение того, что параметры приемлемости размноженного продукта клеточной терапии соответствуют критериям приемлемости в первый момент времени, продолжение размножения продукта клеточной терапии с по меньшей мере части полученного продукта клеточной терапии с помощью методики размножения клеток вплоть до второго момента времени, и

в ответ на определение того, что параметры приемлемости размноженного продукта клеточной терапии не соответствуют критериям приемлемости во второй момент времени:

определение возможности повторного выполнения размножения продукта клеточной терапии с помощью методики размножения клеток с первого момента времени на основании параметров приемлемости во второй момент времени,

в ответ на определение того, что повторное выполнение возможно, повторное выполнение размножения продукта клеточной терапии из по меньшей мере части продукта клеточной терапии, полученного во второй момент времени, с помощью методики размножения клеток с первого момента времени для получения продукта клеточной терапии,

оценку времени завершения размножения продукта клеточной терапии после повторного выполнения размножения продукта клеточной терапии с первого момента времени, и

изменение с помощью вычислительного устройства расписания лечебных событий пациента и завершение последующего размножения продукта клеточной терапии с первого момента времени,

причем изменение расписания лечебных событий пациента выполняют на основании расчетного времени завершения размножения продукта клеточной терапии и времени лечебных событий до или после инфузии размноженного продукта клеточной терапии в организм пациента,

П.2. Способ по п.1, в котором продукт клеточной терапии содержит Т-клетки.

П.3. Способ по п.1, в котором продукт клеточной терапии содержит инфильтрирующие опухоль лимфоциты (TIL).

П.4. Способ по п.1, в котором лечебные события пациента включают одно или более из периодов пребывания пациента в стационаре, даты резекции, даты лимфодеплеции, даты инфузии пациенту продукта клеточной терапии и даты лечения IL-2.

П.5. Способ по п.1, в котором определение того, соответствуют ли параметры приемлемости размноженного продукта клеточной терапии критериям приемлемости, включает определение параметров приемлемости размноженного продукта клеточной терапии во множестве моментов времени после начала размножения полученного продукта клеточной терапии, причем множество моментов времени включает первый и второй моменты времени.

П.6. Способ по п.5, в котором изменение расписания лечебных событий пациента включает изменение расписания лечебных событий пациента в ответ на определение того, что параметры приемлемости размноженного продукта клеточной терапии не соответствуют критериям приемлемости в любом из множества моментов времени.

П.7. Способ по п.5, в котором изменение расписания лечебных событий пациента включает прекращение лечебных событий пациента в ответ на определение того, что параметры приемлемости размноженного продукта клеточной терапии не соответствуют критериям приемлемости в любой из множества моментов времени из-за загрязнения.

П.8. Способ по п.5, в котором в ответ на определение того, что параметры приемлемости размноженного продукта клеточной терапии не соответствуют критериям приемлемости в любой из множества моментов времени из-за загрязнения, последующее размножение продукта клеточной терапии прекращают.

П.9. Способ по п.8, в котором определение параметров приемлемости размноженного продукта клеточной терапии включает одно или более из определения жизнеспособности, стерильности, количества клеток, количества микоплазм, количества CD3, результата анализа эндотоксина и результата анализа окрашивания по Граму.

П.10. Способ по п.9, в котором методика размножения клеток включает этап быстрого размножения,

причем способ дополнительно включает

определение того, соответствуют ли параметры приемлемости размноженного продукта клеточной терапии критериям приемлемости до этапа быстрого размножения; а также

в ответ на определение того, что параметры приемлемости размноженного продукта клеточной терапии соответствуют критериям приемлемости, назначение даты лимфодеплеции на дату, предшествующую завершению производства размноженного продукта клеточной терапии, назначение даты инфузии на дату, следующую за завершением производства размноженного продукта клеточной терапии, и назначение даты лечения IL-2 после даты инфузии.

П.11. Способ по п.1, в котором методика размножения клеток включает культивирование продукта клеточной терапии в отдельном биореакторе с закрытым контейнером.

П.12. Способ по п.1, в котором оценка времени завершения размножения продукта клеточной терапии после повторного выполнения размножения продукта клеточной терапии с первого момента времени включает определение времени, необходимого для завершения процесса размножения с первого момента времени, на основе одного или обоих из параметров приемлемости во второй момент времени и параметров приемлемости, связанных с популяцией клеток, применяемых для повторного выполнения размножения продукта клеточной терапии с первого момента времени.

П.13. Способ по п.1, в котором запрос на заказ клеток для размножения продукта клеточной терапии принимается из интерфейса на стороне больницы, причем способ дополнительно включает передачу после приема запроса на заказ клеток подтверждения, включающего один или оба из специфичного для пациента идентификатора и идентификатора заказа клеток, в интерфейс на стороне больницы о том, что запрос на заказ клеток, связанный с пациентом, был принят.

П.14. Способ по п.13, дополнительно включающий назначение набора дат, соответствующих множеству моментов времени, включая первый и второй моменты времени, для определения того, соответствуют ли параметры приемлемости размноженного продукта клеточной терапии критериям приемлемости во время размножения продукта клеточной терапии в зависимости от методики размножения клеток и от того, когда принят запрос на заказ клеток.

П.15. Способ по п.13, дополнительно включающий передачу, после изменения расписания лечебных событий пациента, в интерфейс на стороне больницы обновленного расписания лечебных событий пациента, связанного с идентификатором конкретного пациента.

П.16. Способ по п.15, дополнительно включающий

передачу в логистический интерфейс заказа на получение, связанного со специфичным для пациента идентификатором, на основе времени завершения; а также

передачу в интерфейс на стороне больницы расписания лечебных событий пациента, связанных со специфичным для пациента идентификатором, на основе времени завершения.

П.17. Способ по п.16, дополнительно включающий в ответ на определение того, что повторное выполнение размножения продукта клеточной терапии с первого момента времени возможно:

отделение с помощью вычислительного устройства идентификатора заказа клеток от специфичного для пациента идентификатора, а также

генерирование с помощью вычислительного устройства нового идентификатора заказа клеток, связанного с запросом на заказ клеток, и связывание нового идентификатора заказа клеток со специфичным для пациента идентификатором.

П.18. Способ по п.17, в котором запрос на заказ клеток для размножения продукта клеточной терапии принимается из интерфейса на стороне больницы, причем способ дополнительно включает передачу специфичного для пациента идентификатора, включающего новый идентификатор заказа клеток, и расчетного времени завершения размножения продукта клеточной терапии в интерфейс на стороне больницы.

П.19. Способ по п.17, дополнительно включающий

генерирование с помощью вычислительного устройства нового расписания событий доставки и логистики, связанных с лечебными событиями пациента, на основе изменения расписания лечебных событий пациента, а также

передачу нового расписания событий доставки и логистики, связанного со специфичным для пациента идентификатором, включая новый идентификатор заказа клеток, в логистический интерфейс на основе изменения расписания событий доставки и логистики.

П.20. Способ по п.17, дополнительно включающий связывание с помощью вычислительного устройства со специфичным для пациента идентификатором в каждый момент времени, когда выполняется определение того, соответствуют ли параметры приемлемости определенным критериям приемлемости, нового идентификатора заказа клеток, включающего поля, соответствующие каждому соответствующему моменту времени, и результата определения.

П.21. Способ по п.20, в котором планирование включает планирование с помощью вычислительного устройства лечебных событий пациента на основе специфичного для пациента идентификатора, включающего новый идентификатор заказа клеток.

П.22. Способ по п.21, дополнительно включающий, в ответ на определение того, что повторное выполнение невозможно, отмену с помощью вычислительного устройства лечебных событий пациента, запланированных после второго момента времени.

П.23. Способ по п.22, дополнительно включающий передачу информации об отмене лечебных событий пациента в интерфейс на стороне больницы и логистический интерфейс.

П.24. Способ по п.23, дополнительно включающий, в ответ на определение того, что повторное выполнение невозможно, уничтожение размноженного продукта клеточной терапии и отсоединение специфичного для пациента идентификатора от идентификатора заказа клеток.

П.25. Способ лечения пациента с помощью размноженного продукта клеточной терапии, полученного способом по п.1, в соответствии с измененным расписанием лечебных событий пациента.

П.26. Способ производства продукта клеточной терапии для пациента, включающий

прием в вычислительном устройстве запроса на заказ клеток для производства продукта клеточной терапии для пациента, производственных интервалов на множестве производственных предприятий для производства продукта клеточной терапии, причем

производственные интервалы для соответствующего производственного предприятия принимаются в вычислительном устройстве от компьютерной подсистемы производителя, связанной с соответствующим производственным предприятием, и предварительного расписания лечебных событий пациента для лечения пациента продуктом клеточной терапии;

определение и отображение в пользовательском интерфейсе планирования с помощью вычислительного устройства множества доступных производственных интервалов для производства продукта клеточной терапии на основе предварительного расписания лечебных событий пациента;

после выбора одной из доступных производственных интервалов, выполнение в медицинском учреждении процедуры на пациенте по получению солидной опухоли от пациента в соответствии с предварительным расписанием лечебных событий пациента и доступным производственным интервалом;

доставку полученной солидной опухоли на производственное предприятие, соответствующее доступному производственному интервалу, в соответствии с доступным производственным интервалом;

инициирование после приема полученной солидной опухоли на производственном предприятии производства продукта клеточной терапии из по меньшей мере части полученной солидной опухоли с помощью методики размножения клеток;

определение во время производства продукта клеточной терапии параметров приемлемости произведенного продукта клеточной терапии в первый момент времени и во второй момент времени, следующий за первым моментом времени, и соответствуют ли параметры приемлемости критериям приемлемости, связанным с соответствующим моментом времени, причем параметры приемлемости определяют на основе результата анализа, связанного с соответствующим моментом времени;

изменение с помощью вычислительного устройства производственного расписания для производства продукта клеточной терапии, производственных интервалов, соответствующих производственному предприятию, и предварительного расписания лечебных событий пациента на основе того, соблюдаются ли критерии приемлемости в один или оба из первого и второго моментов времени; а также

завершение производства продукта клеточной терапии в соответствии с измененным производственным расписанием, если критерии приемлемости соблюдены как в первый, так и во второй момент времени.

П.27. Способ по п.26, дополнительно включающий доставку произведенного продукта клеточной терапии в медицинское учреждение.

П.28. Способ по п.26, дополнительно включающий после приема запроса на заказ клеток генерирование с помощью вычислительного устройства специфичного для пациента идентификатора, связанного с пациентом и запросом на заказ клеток.

П.29. Способ по п.28, дополнительно включающий автоматическое генерирование с помощью вычислительного устройства транспортной этикетки для контейнера для полученной солидной опухоли, транспортной этикетки, включающей специфичный для пациента идентификатор, запрос на заказ клеток, производственный интервал и производственное предприятие, соответствующее доступному производственному интервалу.

П.30. Способ по п.29, дополнительно включающий автоматическое генерирование с помощью вычислительного устройства производственной этикетки для контейнера для полученной солидной опухоли, причем производственная этикетка содержит момент времени, соответствующий производственному процессу, применяемому для производства продукта клеточной терапии, когда генерируется производственная этикетка, штрихкод, идентифицирующий контейнер, специфичный для пациента идентификатор, производственные этапы, завершенные в данный момент времени, параметры приемлемости, связанные с завершенными процессами, и производственный процесс, выполняемый в данный момент времени.

П.31. Способ по п.26, в котором продукт клеточной терапии содержит Т-клетки.

П.32. Способ по п.26, в котором продукт клеточной терапии содержит инфильтрирующие опухоль лимфоциты (TIL).

П.33. Способ по п.26, в котором лечебные события пациента включают одно или более из периодов пребывания пациента в стационаре, даты резекции, даты лимфодеплеции, даты инфузии пациенту продукта клеточной терапии и даты лечения IL-2.

П.34. Способ по п.26, в котором определение того, соответствуют ли параметры приемлемости произведенного продукта клеточной терапии критериям приемлемости, включает определение параметров приемлемости произведенного продукта клеточной терапии во множестве моментов времени после

начала размножения принятого продукта клеточной терапии, причем множество моментов времени включает первый и второй моменты времени.

П.35. Способ по п.34, дополнительно включающий изменение расписания с помощью вычислительного устройства лечебных событий пациента и завершение последующего размножения продукта клеточной терапии, при этом изменение расписания лечебных событий пациента включает изменение расписания лечебных событий пациента в ответ на определение того, что параметры приемлемости произведенного продукта клеточной терапии не соответствуют критериям приемлемости в любой из множества моментов времени.

П.36. Способ по п.34, в котором изменение расписания лечебных событий пациента включает прекращение лечебных событий пациента в ответ на определение того, что параметры приемлемости произведенного продукта клеточной терапии не соответствуют критериям приемлемости в любой из множества моментов времени из-за загрязнения.

П.37. Способ по п.34, в котором в ответ на определение того, что параметры приемлемости произведенного продукта клеточной терапии не соответствуют критериям приемлемости в любой из множества моментов времени из-за загрязнения, последующее размножение продукта клеточной терапии прекращают.

П.38. Способ по п.37, в котором определение параметров приемлемости произведенного продукта клеточной терапии включает одно или более из определения жизнеспособности, стерильности, количества клеток, количества микоплазм, количества CD3, результата анализа эндотоксина и результата анализа окрашивания по Граму.

П.39. Способ по п.38, в котором методика размножения клеток включает этап быстрого размножения, причем способ дополнительно включает

определение того, соответствуют ли параметры приемлемости произведенного продукта клеточной терапии критериям приемлемости до этапа быстрого размножения; а также

в ответ на определение того, что параметры приемлемости произведенного продукта клеточной терапии соответствуют критериям приемлемости, назначение даты лимфодеплеции на дату, предшествующую завершению производства продукта клеточной терапии, назначение даты инфузии на дату, следующую за завершением производства продукта клеточной терапии, и назначение даты лечения IL-2 после даты инфузии.

П.40. Способ по п.26, в котором методика размножения клеток включает культивирование продукта клеточной терапии в отдельном биореакторе с закрытым контейнером.

П.41. Способ по п.26, дополнительно включающий оценку с помощью вычислительного устройства времени завершения размножения продукта клеточной терапии, причем оценка времени завершения размножения продукта клеточной терапии после повторного выполнения размножения продукта клеточной терапии с первого момента времени включает определение времени, необходимого для завершения процесса размножения с первого момента времени, на основе одного или обоих из параметров приемлемости во второй момент времени и параметров приемлемости, связанных с популяцией клеток, применяемых для повторного выполнения размножения продукта клеточной терапии с первого момента времени.

П.42. Способ по п.29, в котором запрос на заказ клеток для размножения продукта клеточной терапии принимается из интерфейса на стороне больницы, причем способ дополнительно включает передачу после приема запроса на заказ клеток подтверждения, включающего один или оба из специфичного для пациента идентификатора и идентификатора заказа клеток, в интерфейс на стороне больницы о том, что запрос на заказ клеток, связанный с пациентом, был принят.

П.43. Способ по п.42, дополнительно включающий назначение набора дат, соответствующих множеству моментов времени, включая первый и второй моменты времени, для определения того, соответствуют ли параметры приемлемости произведенного продукта клеточной терапии критериям приемлемости во время размножения продукта клеточной терапии в зависимости от методики размножения клеток и когда принят запрос на заказ клеток.

П.44. Способ по п.43, дополнительно включающий передачу, после изменения расписания лечебных событий пациента, в интерфейс на стороне больницы обновленного расписания лечебных событий пациента, связанного с идентификатором конкретного пациента.

П.45. Способ по п.44, дополнительно включающий

передачу в логистический интерфейс заказа на получение, связанного со специфичным для пациента идентификатором, на основе времени завершения; а также

передачу в интерфейс на стороне больницы расписания лечебных событий пациента, связанных со специфичным для пациента идентификатором, на основе времени завершения.

П.46. Способ по п.45, дополнительно включающий в ответ на определение того, что повторное выполнение размножения продукта клеточной терапии с первого момента времени возможно

отделение с помощью вычислительного устройства идентификатора заказа клеток от специфичного для пациента идентификатора, а также

генерирование с помощью вычислительного устройства нового идентификатора заказа клеток, свя-

занного с запросом на заказ клеток, и связывание нового идентификатора заказа клеток со специфичным для пациента идентификатором.

П.47. Способ по п.46, в котором запрос на заказ клеток для размножения продукта клеточной терапии принимается из интерфейса на стороне больницы, причем способ дополнительно включает передачу специфичного для пациента идентификатора, включающего новый идентификатор заказа клеток, и расчетного времени завершения размножения продукта клеточной терапии в интерфейс на стороне больницы.

П.48. Способ по п.47, дополнительно включающий

генерирование с помощью вычислительного устройства нового расписания событий доставки и логистики, связанных с лечебными событиями пациента, на основе изменения расписания лечебных событий пациента, а также

передачу нового расписания событий доставки и логистики, связанного со специфичным для пациента идентификатором, включая новый идентификатор заказа клеток, в логистический интерфейс на основе изменения расписания событий доставки и логистики.

П.49. Способ по п.48, дополнительно включающий связывание с помощью вычислительного устройства со специфичным для пациента идентификатором в каждый момент времени, когда выполняется определение того, соответствуют ли параметры приемлемости критериям приемлемости, нового идентификатора заказа клеток, включающего поля, соответствующие каждому соответствующему моменту времени, и результата определения.

П.50. Способ по п.49, в котором планирование включает планирование с помощью вычислительного устройства лечебных событий пациента на основе специфичного для пациента идентификатора, включающего новый идентификатор заказа клеток.

П.51. Способ по п.50, дополнительно включающий, в ответ на определение того, что повторное выполнение невозможно, отмену с помощью вычислительного устройства лечебных событий пациента, запланированных после второго момента времени.

П.52. Способ по п.51, дополнительно включающий передачу информации об отмене лечебных событий пациента в интерфейс на стороне больницы и логистический интерфейс.

П.53. Способ по п.52, дополнительно включающий, в ответ на определение того, что повторное выполнение невозможно, уничтожение размноженного продукта клеточной терапии и отсоединение специфичного для пациента идентификатора от идентификатора заказа клеток.

П.54. Способ лечения пациента с помощью произведенного продукта клеточной терапии, полученного способом по п.26, в соответствии с измененным расписанием лечебных событий пациента.

П.55. Способ производства продукта клеточной терапии, включающий

прием на производственном предприятии солидной опухоли, полученной от пациента;

генерирование с помощью вычислительного устройства производственной этикетки для производственного контейнера, предназначенного для применения в процессе производства продукта клеточной терапии из по меньшей мере части полученной солидной опухоли с помощью методики размножения клеток, причем производственная этикетка включает информацию, связанную с пациентом, производственным процессом и качеством произведенного продукта клеточной терапии;

инициирование процесса производства продукта клеточной терапии, включающего

выполнение в медицинском учреждении процедуры на пациенте для получения солидной опухоли от пациента,

доставку полученной солидной опухоли на производственное предприятие,

после приема полученной солидной опухоли на производственном предприятии, динамическое планирование с помощью вычислительного устройства лечебных событий пациента, причем динамическое планирование зависит от параметров приемлемости впоследствии полученного размноженного продукта клеточной терапии,

инициирование размножения продукта клеточной терапии из по меньшей мере части полученной солидной опухоли с помощью методики размножения клеток и определение параметров приемлемости размноженного продукта клеточной терапии во множестве моментов времени,

выполнение контроля качества для определения параметров приемлемости произведенного продукта клеточной терапии во множестве моментов времени;

прием в вычислительном устройстве параметров приемлемости произведенного продукта клеточной терапии;

генерирование с помощью вычислительного устройства обновленной производственной этикетки, соответствующей каждому из множества моментов времени, причем обновленная производственная этикетка содержит обновленную информацию, связанную с качеством произведенного продукта клеточной терапии, причем обновленная информация включает параметры приемлемости в соответствующий момент времени;

считывание с помощью вычислительного устройства обновленной производственной этикетки в каждый из множества моментов времени; а также

завершение размножения продукта клеточной терапии на основе информации, считанной с обновленной производственной этикетки в каждый из множества моментов времени.

П.56. Способ по п.55, дополнительно включающий предоставление с помощью вычислительного устройства предупреждающего сигнала, если

информация, относящаяся к пациенту, на обновленной производственной этикетке для последующего производственного этапа не соответствует информации о пациенте на производственной этикетке для непосредственно предшествующего производственного этапа, или

параметры приемлемости на обновленной производственной этикетке для данного момента времени производственного процесса не соответствуют критериям приемлемости для этого момента времени производственного процесса,

причем параметры приемлемости включают одно или более из жизнеспособности, стерильности, количества клеток, количества микоплазм, количества CD3, результата анализа эндотоксина и результата анализа окрашивания по Граму.

П.57. Способ по п.55, в котором информация, относящаяся к пациенту, содержит специфичный для пациента идентификатор и идентификатор заказа клеток, связанный с запросом на заказ клеток для производства продукта клеточной терапии для пациента.

П.58. Способ по п.55, в котором методика размножения клеток включает культивирование продукта клеточной терапии в отдельном биореакторе с закрытым контейнером.

П.59. Способ по п.55, в котором производственная этикетка включает штрих-код, кодирующий информацию, относящуюся к пациенту, производственному процессу и качеству произведенного продукта клеточной терапии.

П.60. Способ по п.56, дополнительно включающий назначение набора дат, соответствующих множеству моментов времени, включая первый момент времени и второй момент времени, следующий за первым моментом времени, для определения того, соответствуют ли параметры приемлемости произведенного продукта клеточной терапии критериям приемлемости во время производственного процесса в зависимости от применяемой методики размножения клеток и от того, когда запрос на заказ клеток принят на производственном предприятии.

П.61. Способ по п.60, дополнительно включающий интеграцию с логистическим интерфейсом, прием информации о статусе курьера через вычислительную подсистему курьера, причем информация о статусе курьера включает и в ответ на прием информации о статусе курьера определение расписания доставки для доставки произведенного продукта клеточной терапии на основе определенного расписания производства и формирование транспортной этикетки для транспортировочного контейнера, содержащего произведенный продукт клеточной терапии.

П.62. Способ по п.60, дополнительно включающий передачу логистическому предприятию запроса на доставку на основе определенного расписания доставки.

П.63. Способ по п.60, дополнительно включающий генерирование транспортной этикетки для транспортировочного контейнера, содержащего произведенный продукт клеточной терапии, до выполнения окончательного контроля качества, причем транспортная этикетка указывает, что произведенный продукт клеточной терапии не подлежит выпуску, если только результат окончательного контроля качества не покажет, что соответствующие параметры приемлемости соответствуют соответствующим критериям приемлемости.

П.64. Способ по п.56, дополнительно включающий

после определения того, что параметры приемлемости произведенного продукта клеточной терапии соответствуют критериям приемлемости, определение даты завершения производства продукта клеточной терапии;

генерирование с помощью вычислительного устройства расписания лечебных событий пациента, соответствующего применению продукта клеточной терапии для лечения пациента, на основе даты завершения;

передачу в логистический интерфейс заказа на получение на основе даты завершения; а также

передачу в интерфейс на стороне больницы расписания лечебных событий пациента.

П.65. Способ по п.55, в котором продукт клеточной терапии содержит Т-клетки.

П.66. Способ по п.55, в котором продукт клеточной терапии содержит инфильтрирующие опухоль лимфоциты (TIL).

П.67. Способ по п.55, в котором лечебные события пациента включают одно или более из периодов пребывания пациента в стационаре, даты резекции, даты лимфодеплеции, даты инфузии пациенту продукта клеточной терапии и даты лечения IL-2.

П.68. Способ по п.56, в котором определение того, соответствуют ли параметры приемлемости размноженного продукта клеточной терапии критериям приемлемости, включает определение параметров приемлемости размноженного продукта клеточной терапии во множестве моментов времени после начала размножения полученного продукта клеточной терапии, причем множество моментов времени включает первый и второй моменты времени.

П.69. Способ по п.68, дополнительно включающий изменение расписания с помощью вычислительного устройства лечебных событий пациента и завершение последующего размножения продукта клеточной терапии, при этом изменение расписания лечебных событий пациента включает изменение

расписания лечебных событий пациента в ответ на определение того, что параметры приемлемости размноженного продукта клеточной терапии не соответствуют критериям приемлемости в любой из множества моментов времени.

П.70. Способ по п.68, в котором изменение расписания лечебных событий пациента включает прекращение лечебных событий пациента в ответ на определение того, что параметры приемлемости размноженного продукта клеточной терапии не соответствуют критериям приемлемости в любой из множества моментов времени из-за загрязнения.

П.71. Способ по п.68, в котором в ответ на определение того, что параметры приемлемости размноженного продукта клеточной терапии не соответствуют критериям приемлемости в любой из множества моментов времени из-за загрязнения, последующее размножение продукта клеточной терапии прекращают.

П.72. Способ по п.71, в котором определение параметров приемлемости размноженного продукта клеточной терапии включает одно или более из определения жизнеспособности, стерильности, количества клеток, количества микоплазм, количества CD3, результата анализа эндотоксина и результата анализа окрашивания по Граму.

П.73. Способ по п.72, в котором методика размножения клеток включает этап быстрого размножения, причем способ дополнительно включает

определение того, соответствуют ли параметры приемлемости размноженного продукта клеточной терапии критериям приемлемости до этапа быстрого размножения; а также

в ответ на определение того, что параметры приемлемости размноженного продукта клеточной терапии соответствуют критериям приемлемости, назначение даты лимфодеплеции на дату, предшествующую завершению производства продукта клеточной терапии, назначение даты инфузии на дату, следующую за завершением производства продукта клеточной терапии, и назначение даты лечения IL-2 после даты инфузии.

П.74. Способ по п.55, в котором методика размножения клеток включает культивирование продукта клеточной терапии в отдельном биореакторе с закрытым контейнером.

П.75. Способ по п.55, в котором оценка времени завершения размножения продукта клеточной терапии после повторного выполнения размножения продукта клеточной терапии с первого момента времени включает определение времени, необходимого для завершения процесса размножения с первого момента времени, на основе одного или обоих из параметров приемлемости во второй момент времени и параметров приемлемости, связанных с популяцией клеток, применяемых для повторного выполнения размножения продукта клеточной терапии с первого момента времени.

П.76. Способ по п.57, в котором запрос на заказ клеток для размножения продукта клеточной терапии принимается из интерфейса на стороне больницы, причем способ дополнительно включает передачу после приема запроса на заказ клеток подтверждения, включающего один или оба из специфичного для пациента идентификатора и идентификатора заказа клеток, в интерфейс на стороне больницы о том, что запрос на заказ клеток, связанный с пациентом, был принят.

П.77. Способ по п.76, дополнительно включающий назначение набора дат, соответствующих множеству моментов времени, включая первый и второй моменты времени, для определения того, соответствуют ли параметры приемлемости размноженного продукта клеточной терапии критериям приемлемости во время размножения продукта клеточной терапии в зависимости от методики размножения клеток и от того, когда принят запрос на заказ клеток.

П.78. Способ по п.76, дополнительно включающий передачу, после изменения расписания лечебных событий пациента, в интерфейс на стороне больницы обновленного расписания лечебных событий пациента, связанного с идентификатором конкретного пациента.

П.79. Способ по п.78, дополнительно включающий передачу в логистический интерфейс заказа на получение, связанного со специфичным для пациента идентификатором, на основе времени завершения; и передачу в интерфейс на стороне больницы расписания лечебных событий пациента, связанных со специфичным для пациента идентификатором, на основе времени завершения.

П.80. Способ по п.79, дополнительно включающий в ответ на определение того, что повторное выполнение размножения продукта клеточной терапии с первого момента времени возможно

отделение с помощью вычислительного устройства идентификатора заказа клеток от специфичного для пациента идентификатора, а также

генерирование с помощью вычислительного устройства нового идентификатора заказа клеток, связанного с запросом на заказ клеток, и связывание нового идентификатора заказа клеток со специфичным для пациента идентификатором.

П.81. Способ по п.80, в котором запрос на заказ клеток для размножения продукта клеточной терапии принимается из интерфейса на стороне больницы, причем способ дополнительно включает передачу специфичного для пациента идентификатора, включающего новый идентификатор заказа клеток, и расчетного времени завершения размножения продукта клеточной терапии в интерфейс на стороне больницы.

П.82. Способ по п.80, дополнительно включающий

генерирование с помощью вычислительного устройства нового расписания событий доставки и логистики, связанных с лечебными событиями пациента, на основе изменения расписания лечебных событий пациента, а также

передачу нового расписания событий доставки и логистики, связанного со специфичным для пациента идентификатором, включая новый идентификатор заказа клеток, в логистический интерфейс на основе изменения расписания событий доставки и логистики.

П.83. Способ по п.80, дополнительно включающий связывание с помощью вычислительного устройства со специфичным для пациента идентификатором в каждый момент времени, когда выполняется определение того, соответствуют ли параметры приемлемости определенным критериям приемлемости, нового идентификатора заказа клеток, включающего поля, соответствующие каждому соответствующему моменту времени, и результата определения.

П.84. Способ по п.83, в котором планирование включает планирование с помощью вычислительного устройства лечебных событий пациента на основе специфичного для пациента идентификатора, включающего новый идентификатор заказа клеток.

П.85. Способ по п.84, дополнительно включающий, в ответ на определение того, что повторное выполнение невозможно, отмену с помощью вычислительного устройства лечебных событий пациента, запланированных после второго момента времени.

П.86. Способ по п.85, дополнительно включающий передачу информации об отмене лечебных событий пациента в интерфейс на стороне больницы и логистический интерфейс.

П.87. Способ по п.86, дополнительно включающий, в ответ на определение того, что повторное выполнение невозможно, уничтожение размноженного продукта клеточной терапии и отсоединение специфичного для пациента идентификатора от идентификатора заказа клеток.

П.88. Способ лечения пациента с помощью размноженного продукта клеточной терапии, полученного способом по п.55, в соответствии с измененным расписанием лечебных событий пациента.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ координации производства размноженных Т-клеток для лечения рака у пациента, причем способ включает

производство продукта клеточной терапии путем размножения популяции клеток, полученных из опухоли пациента, в продукт клеточной терапии, причем производство включает

прием с помощью вычислительного устройства запроса на заказ клеток для размножения популяции клеток для пациента;

генерирование с помощью вычислительного устройства идентификатора заказа клеток, включающего индивидуальный идентификатор пациента, связанный с запросом на заказ клеток;

инициирование процесса производства продукта клеточной терапии;

после приема популяции клеток на производственном предприятии, определение с помощью вычислительного устройства предварительного расписания процесса размножения клеток и предварительного расписания лечебных событий пациента,

инициирование размножения продукта клеточной терапии по меньшей мере из части полученной популяции клеток с помощью процесса размножения клеток и определение параметров приемлемости размноженного продукта клеточной терапии во множестве моментов времени в процессе размножения клеток,

определение того, соответствуют ли параметры приемлемости размноженного продукта клеточной терапии критериям приемлемости, и

в ответ на определение того, что параметры приемлемости размноженного продукта клеточной терапии соответствуют критериям приемлемости, завершение процесса размножения клеток в соответствии с предварительным расписанием для указанного процесса с получением произведенного продукта клеточной терапии, и

лечение пациента в соответствии с предварительным расписанием лечебных событий пациента,

где лечебные события пациента включают одно или более из периодов пребывания пациента в стационаре, даты резекции, даты лимфодеплеции, даты инфузии пациенту произведенного продукта клеточной терапии и даты лечения IL-2.

2. Способ по п.1, дополнительно включающий

в ответ на определение того, что параметры приемлемости размноженного продукта клеточной терапии не соответствуют критериям приемлемости, определение с помощью вычислительного устройства измененного расписания процесса и измененного расписания лечебных событий пациента,

завершение последующего размножения продукта клеточной терапии в соответствии с измененным расписанием процесса,

при этом измененное расписание лечебных событий пациента основано клинически определенного временного промежутка между инфузией произведенного продукта клеточной терапии в организм паци-

ента и лечебными событиями пациента до или после инфузии произведенного продукта клеточной терапии в организм пациента.

3. Способ по п.2, где множество моментов времени в процессе размножения клеток включают первый момент времени и во второй момент времени, следующий за первым моментом времени, при этом способ дополнительно включает

определение того, соответствуют ли параметры приемлемости размноженного продукта клеточной терапии критериям приемлемости в первый момент времени,

в ответ на определение того, что параметры приемлемости размноженного продукта клеточной терапии соответствуют критериям приемлемости в первый момент времени, продолжение размножения продукта клеточной терапии в соответствии с предварительным расписанием процесса.

4. Способ по п.3, дополнительно включающий

в ответ на определение того, что параметры приемлемости размноженного продукта клеточной терапии не соответствуют критериям приемлемости во второй момент времени

определение возможности повторного выполнения размножения продукта клеточной терапии с помощью процесса размножения клеток с первого момента времени на основании параметров приемлемости во второй момент времени,

в ответ на определение того, что повторное выполнение возможно, повторное выполнение размножения продукта клеточной терапии по меньшей мере из части продукта клеточной терапии, полученного во второй момент времени, с помощью процесса размножения клеток с первого момента времени для получения продукта клеточной терапии,

оценку времени завершения размножения продукта клеточной терапии после повторного выполнения размножения продукта клеточной терапии с первого момента времени и

определение с помощью вычислительного устройства измененного расписания лечебных событий пациента и завершение последующего размножения продукта клеточной терапии с первого момента времени,

причем измененное расписание лечебных событий пациента основано на расчетном времени завершения размножения продукта клеточной терапии и времени лечебных событий до или после инфузии произведенного продукта клеточной терапии в организм пациента.

5. Способ по п.4, в котором в ответ на определение того, что параметры приемлемости размноженного продукта клеточной терапии не соответствуют критериям приемлемости в любом из множества моментов времени из-за загрязнения, последующее размножение продукта клеточной терапии прекращают.

6. Способ по п.1, в котором определение параметров приемлемости размноженного продукта клеточной терапии включает одно или более из определения жизнеспособности, стерильности, количества клеток, количества микоплазм, количества CD3, результата анализа эндотоксина и результата анализа окрашивания по Граму.

7. Способ по п.1, в котором процесс размножения клеток включает этап быстрого размножения, причем способ дополнительно включает

определение того, соответствуют ли параметры приемлемости размноженного продукта клеточной терапии критериям приемлемости до этапа быстрого размножения; а также

в ответ на определение того, что параметры приемлемости размноженного продукта клеточной терапии соответствуют критериям приемлемости, назначение даты лимфодеплеции на дату, предшествующую завершению производства размноженного продукта клеточной терапии, назначение даты инфузии на дату, следующую за завершением производства размноженного продукта клеточной терапии, и назначение даты лечения IL-2 после даты инфузии.

8. Способ производства продукта клеточной терапии для лечения рака у пациента, включающий

прием в вычислительном устройстве запроса на заказ клеток для производства продукта клеточной терапии для пациента, информации о производственных мощностях на множестве производственных предприятий для производства продукта клеточной терапии, причем информация о производственных мощностях для соответствующего производственного предприятия принимается в вычислительном устройстве от компьютерной подсистемы производителя, связанной с соответствующим производственным предприятием, и предварительного расписания лечебных событий пациента для лечения пациента продуктом клеточной терапии;

определение и отображение в пользовательском интерфейсе планирования с помощью вычислительного устройства множества доступных производственных мощностей для производства продукта клеточной терапии на основе предварительного расписания лечебных событий пациента;

после выбора одной из доступных производственных мощностей, выполнение в медицинском учреждении процедуры на пациенте по получению солидной опухоли от пациента в соответствии с предварительным расписанием лечебных событий пациента и доступными производственными мощностями;

доставку полученной солидной опухоли или первой популяции клеток, полученных из полученной солидной опухоли на производственное предприятие, соответствующее доступным производственным мощностям, с соответствующими доступными производственными мощностями;

обновление доступности производственных мощностей для производства продукта клеточной тера-

пии на основании предварительного расписания процесса производства продукта клеточной терапии;

на производственном предприятии получение второй популяции клеток из полученной солидной опухоли и инициирование процесса производства продукта клеточной терапии из некоторых из клеток первой популяции или клеток второй популяции;

определение во время производства продукта клеточной терапии параметров приемлемости произведенного продукта клеточной терапии и соответствуют ли параметры приемлемости критериям приемлемости во множестве моментов времени, включая первый момент времени и во второй момент времени, следующий за первым моментом времени, причем параметры приемлемости определяют на основе результата анализа;

завершение, в ответ на определение того, что критерии приемлемости соблюдены, производства продукта клеточной терапии.

9. Способ по п.8, дополнительно включающий

после получения на производственном предприятии полученной солидной опухоли или первой популяции клеток, полученных из полученной солидной опухоли, генерирование с помощью вычислительного устройства обновленной производственной этикетки для производственного контейнера, предназначенного для применения в процессе производства продукта клеточной терапии по меньшей мере из части полученной солидной опухоли или первой популяции клеток с помощью процесса размножения клеток, причем производственная этикетка включает информацию, связанную с пациентом, производственным процессом продукта клеточной терапии и качеством произведенного продукта клеточной терапии;

генерирование с помощью вычислительного устройства обновленной производственной этикетки, соответствующей каждому из множества моментов времени, причем обновленная производственная этикетка включает обновленную информацию, связанную с качеством произведенного продукта клеточной терапии, содержащую параметры приемлемости в соответствующий момент времени;

считывание с помощью вычислительного устройства обновленной производственной этикетки в каждый из множества моментов времени и

завершение размножения продукта клеточной терапии на основе информации, считанной с обновленной производственной этикетки в каждый из множества моментов времени.

10. Способ по п.9, дополнительно включающий

изменение с помощью вычислительного устройства предварительного расписания процесса производства продукта клеточной терапии, доступности производственных мощностей, соответствующих производственному предприятию, и предварительного расписания лечебных событий пациента на основе того, соблюдаются ли критерии приемлемости во множестве моментов времени, включая один или оба из первого и второго моментов времени, чтобы получить измененное производственное расписание и измененное расписание лечебных событий пациента; и

завершение производства продукта клеточной терапии в соответствии с измененным производственным расписанием,

где определение того, соответствуют ли параметры приемлемости для произведенного продукта клеточной терапии критериям приемлемости, дополнительно включает

определение во время производства продукта клеточной терапии параметров приемлемости произведенного продукта клеточной терапии в первый и второй моменты времени, и соответствуют ли параметры приемлемости критериям приемлемости, связанным с соответствующим моментом времени, причем параметры приемлемости определяют на основе результата анализа, связанного с соответствующим моментом времени;

способ дополнительно включает завершение производства продукта клеточной терапии в соответствии с измененным производственным расписанием, если критерии приемлемости не соблюдены в одном или обеих из первого и второго моментов времени.

11. Способ по п.10, дополнительно включающий генерирование с помощью вычислительного устройства нового расписания для нового расписания событий доставки и логистики, связанных с лечебными событиями пациента, на основе измененного расписания лечебных событий пациента, а также передачу нового расписания событий доставки и логистики, связанного со специфичным для пациента идентификатором, включая новый идентификатор заказа клеток, в логистический интерфейс.

12. Способ по п.9, в котором производственная этикетка включает штрих-код, кодирующий информацию, относящуюся к пациенту, производственному процессу и качеству произведенного продукта клеточной терапии.

13. Способ по п.8, дополнительно включающий назначение набора дат, соответствующих множеству моментов времени, включая первый и второй моменты времени, для определения того, соответствуют ли параметры приемлемости произведенного продукта клеточной терапии критериям приемлемости во время процесса производства продукта клеточной терапии в зависимости от методики размножения клеток и от того, когда принят запрос на заказ клеток.

14. Способ по п.8, в котором параметры приемлемости включают одно или более из жизнеспособности, стерильности, количества клеток, количества микоплазм, количества CD3, результата анализа эн-

дотоксина и результата анализа окрашивания по Граму.

15. Способ по п.8, дополнительно включающий автоматическое генерирование с помощью вычислительного устройства транспортной этикетки для контейнера для полученной солидной опухоли или первой популяции клеток, полученных из полученной солидной опухоли, транспортной этикетки, включающей индивидуальный идентификатор пациента, запрос на заказ клеток, доступные производственные мощности и производственное предприятие с соответствующими доступными производственными мощностями; автоматическое генерирование с помощью вычислительного устройства производственной этикетки для контейнера для полученной солидной опухоли или первой популяции клеток, полученных из полученной солидной опухоли, причем производственная этикетка содержит момент времени, соответствующий производственному процессу, применяемому для производства продукта клеточной терапии, когда генерируется производственная этикетка, код, идентифицирующий контейнер, индивидуальный идентификатор пациента, производственные этапы, завершенные в данный момент времени, параметры приемлемости, связанные с завершенными процессами, и производственный процесс, выполняемый в данный момент времени; и

предоставление с помощью вычислительного устройства предупреждающего сигнала, если

информация, относящаяся к пациенту, на обновленной производственной этикетке для последующего производственного этапа не соответствует информации о пациенте на производственной этикетке для непосредственно предшествующего производственного этапа, или

параметры приемлемости на обновленной производственной этикетке для данного момента времени производственного процесса не соответствуют критериям приемлемости для этого момента времени производственного процесса.

16. Способ по п.8, в котором процесс производства продукта клеточной терапии включает этап быстрого размножения, и способ дополнительно включает

определение того, соответствуют ли параметры приемлемости произведенного продукта клеточной терапии критериям приемлемости до этапа быстрого размножения; а также

в ответ на определение того, что параметры приемлемости произведенного продукта клеточной терапии соответствуют критериям приемлемости, назначение даты лимфодеплеции на дату, предшествующую завершению производства продукта клеточной терапии, назначение даты инфузии на дату, следующую за завершением производства продукта клеточной терапии, и назначение даты лечения IL-2 после даты инфузии.

17. Способ по п.8, в котором клетка содержит Т-клетки.

18. Способ по п.17, в котором продукт клеточной терапии содержит инфильтрирующие опухоль лимфоциты (TIL).

19. Способ по п.8, дополнительно включающий

интеграцию вычислительного устройства с логистическим интерфейсом, прием информации о статусе курьера через вычислительную подсистему курьера, причем информация о статусе курьера включает, в ответ на прием информации о статусе курьера, определение расписания доставки для доставки произведенного продукта клеточной терапии на основе предварительного расписания процесса производства продукта клеточной терапии и формирование транспортной этикетки для транспортировочного контейнера, содержащего произведенный продукт клеточной терапии,

передачу логистическому предприятию запроса на доставку на основе определенного расписания доставки и

генерирование транспортной этикетки для транспортировочного контейнера, содержащего произведенный продукт клеточной терапии, до выполнения окончательного контроля качества, причем транспортная этикетка указывает, что произведенный продукт клеточной терапии не подлежит выпуску, если только результат окончательного контроля качества не покажет, что соответствующие параметры приемлемости соответствуют соответствующим критериям приемлемости.

20. Способ по п.8, дополнительно включающий

определение расчетной даты завершения производства продукта клеточной терапии на основе предварительного расписания процесса производства продукта клеточной терапии;

передачу в логистический интерфейс заказа, основанного на дате завершения; и передачу в интерфейс на стороне больницы предварительного расписания лечебных событий пациента.

21. Способ по п.10, дополнительно включающий

определение измененной даты завершения производства продукта клеточной терапии на основе измененного производственного расписания;

передачу в логистический интерфейс заказа на получение, связанного с индивидуальным идентификатором пациента, на основе измененной даты завершения; а также

передачу в интерфейс на стороне больницы расписания лечебных событий пациента, связанных с индивидуальным идентификатором пациента, на основе измененной даты завершения.

22. Способ производства продукта клеточной терапии, включающий

прием на производственном предприятии солидной опухоли, полученной от пациента, или первой популяции клеток, полученных из солидной опухоли;

генерирование с помощью вычислительного устройства производственной этикетки для производ-

ственного контейнера, предназначенного для применения в производстве продукта клеточной терапии по меньшей мере из части полученной солидной опухоли или первой популяции клеток, причем производственная этикетка включает информацию, связанную с пациентом, процессом производства продукта клеточной терапии и качеством произведенного продукта клеточной терапии;

инициирование процесса производства продукта клеточной терапии, включающего

выполнение в медицинском учреждении процедуры на пациенте для получения солидной опухоли от пациента или первой популяции клеток, полученных из солидной опухоли,

доставку полученной солидной опухоли или первой популяции клеток на производственное предприятие,

после приема полученной солидной опухоли на производственном предприятии, динамическое планирование с помощью вычислительного устройства лечебных событий пациента, причем динамическое планирование зависит от параметров приемлемости полученного впоследствии произведенного продукта клеточной терапии,

инициирование размножения продукта клеточной терапии по меньшей мере из части полученной солидной опухоли или первой популяции клеток с помощью методики размножения клеток и определение параметров приемлемости размножения продукта клеточной терапии во множестве моментов времени,

выполнение контроля качества для определения параметров приемлемости произведенного продукта клеточной терапии во множестве моментов времени;

прием в вычислительном устройстве параметров приемлемости произведенного продукта клеточной терапии;

генерирование с помощью вычислительного устройства обновленной производственной этикетки, соответствующей каждому из множества моментов времени, причем обновленная производственная этикетка содержит обновленную информацию, связанную с качеством произведенного продукта клеточной терапии, причем обновленная информация включает параметры приемлемости в соответствующий момент времени;

считывание с помощью вычислительного устройства обновленной производственной этикетки в каждый из множества моментов времени; а также

завершение размножения продукта клеточной терапии на основе информации, считанной с обновленной производственной этикетки в каждый из множества моментов времени.

23. Способ по п.22, дополнительно включающий предоставление с помощью вычислительного устройства предупреждающего сигнала, если

информация, относящаяся к пациенту, на обновленной производственной этикетке для последующего производственного этапа не соответствует информации о пациенте на производственной этикетке для непосредственно предшествующего производственного этапа или

параметры приемлемости на обновленной производственной этикетке для данного момента времени производственного процесса не соответствуют критериям приемлемости для этого момента времени производственного процесса,

причем параметры приемлемости включают одно или более из жизнеспособности, стерильности, количества клеток, количества микоплазм, количества CD3, результата анализа эндотоксина и результата анализа окрашивания по Граму.

24. Способ по п.22, в котором информация, относящаяся к пациенту, содержит специфичный для пациента идентификатор и идентификатор заказа клеток, связанный с запросом на заказ клеток для производства продукта клеточной терапии для пациента.

25. Способ по п.22, в котором методика размножения клеток включает культивирование продукта клеточной терапии в отдельном биореакторе с закрытым контейнером.

26. Способ по п.22, в котором производственная этикетка включает штрих-код, кодирующий информацию, относящуюся к пациенту, процессу производства продукта клеточной терапии и качеству произведенного продукта клеточной терапии.

27. Способ по п.22, дополнительно включающий назначение набора дат, соответствующих множеству моментов времени, включая первый момент времени и второй момент времени, следующий за первым моментом времени, для определения того, соответствуют ли параметры приемлемости произведенного продукта клеточной терапии критериям приемлемости во время процесса производства продукта клеточной терапии в зависимости от применяемой методики размножения клеток и от того, когда запрос на заказ клеток принят на производственном предприятии.

28. Способ по п.27, дополнительно включающий прием информации о статусе курьера через вычислительную подсистему курьера, в ответ на прием информации о статусе курьера, определение расписания доставки для доставки произведенного продукта клеточной терапии на основе определенного расписания производства и формирование транспортной этикетки для транспортировочного контейнера, содержащего произведенный продукт клеточной терапии.

29. Способ по п.27, дополнительно включающий передачу логистическому предприятию запроса на доставку на основе определенного расписания доставки.

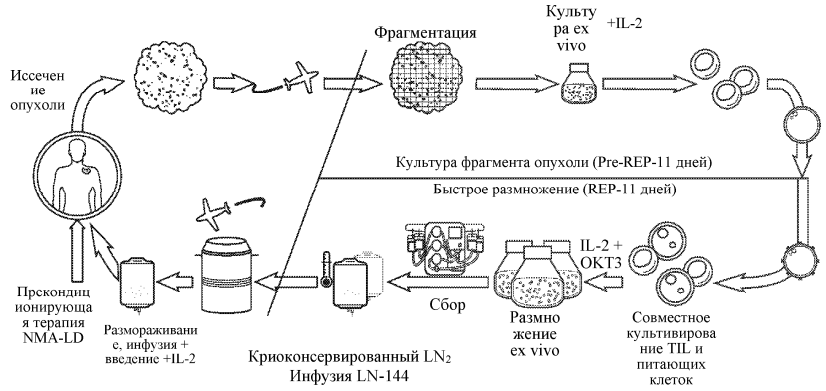
30. Способ по п.22, дополнительно включающий

после определения того, что параметры приемлемости произведенного продукта клеточной терапии соответствуют критериям приемлемости, определение даты завершения производства продукта клеточной терапии;

генерирование с помощью вычислительного устройства расписания лечебных событий пациента, соответствующего применению продукта клеточной терапии для лечения пациента, на основе даты завершения;

передачу в логистический интерфейс заказа на получение на основе даты завершения; а также

передачу в интерфейс на стороне больницы расписания лечебных событий пациента.



Фиг. 1

Процесс GEN 3: около 14–18 дней после этапов A–E

ЭТАП A

Получение образца опухоли пациента (при желании можно заморозить до этапа B)

ЭТАП B

Инициирующее первое размножение
(физическая фрагментация вплоть до 60 фрагментов на контейнер, выращивание в течение от около 1 дня до 7–8 дней в среде, содержащей IL-2, OKT-3 и необязательно антигенпрезентирующие питательные клетки)

ЭТАП C

Переход от инициирующего первого размножения к быстрому второму размножению (TIL с этапа B непосредственно переходят к этапу D в день 7/8)

ЭТАП D

Быстрое второе размножение
(TIL, выращенные в питательной среде, содержащей IL-2, OKT-3 и 2X антигенпрезентирующих питающих клеток; в день 10–11 увеличивают масштаб и добавляют дополнительное количество IL-2)

ЭТАП E

Сбор TIL с этапа D

ЭТАП F

Окончательный состав и/или перенос в инфузионный пакет (необязательно криоконсервация)

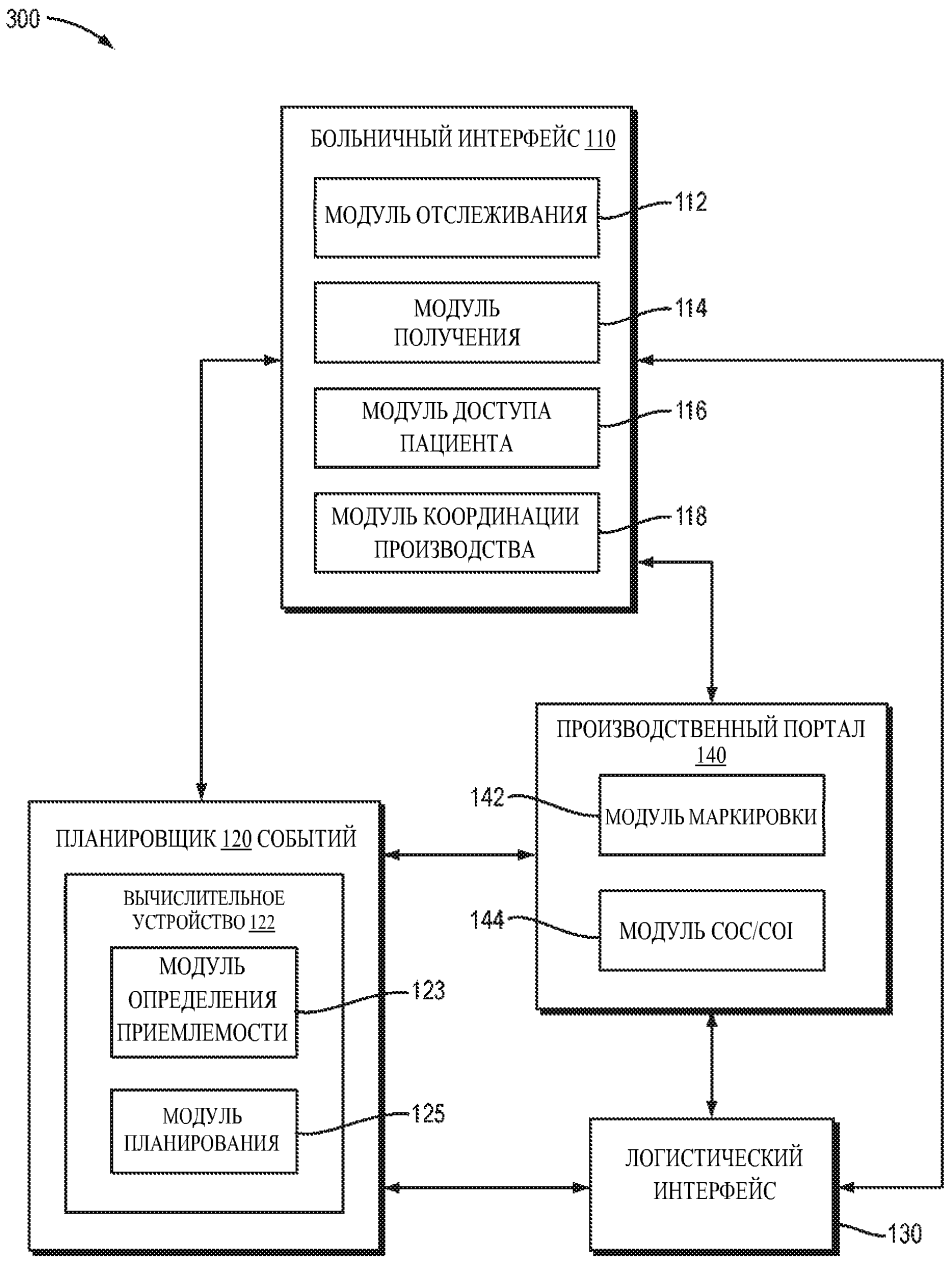
Фиг. 2A

Процесс 2A: около 22 дней после этапов A–E	Процесс GEN 3: около 14–18 дней после этапов A–E
ЭТАП A Получение образца опухоли пациента (необязательно можно заморозить до этапа B; необязательно образец опухоли может быть получен с помощью толстоигольной/небольшой биопсии)	**ЭТАП A** Получение образца опухоли пациента (при желании можно заморозить до этапа B)
ЭТАП B Первое размножение (физическая фрагментация до по меньшей мере 40 фрагментов на контейнер, выращивание в течение от около 3 дней до 14 дней в среде, содержащей IL-2)	**ЭТАП B** Инициирующее первое размножение (физическая фрагментация вплоть до 60 фрагментов на контейнер, выращивание в течение от около 1 дня до 7–8 дней в среде, содержащей IL-2, OKT-3 и необязательно антигенпрезентирующие питательные клетки)
ЭТАП C Переход от первого размножения ко второму размножению (TIL с этапа B непосредственно переходят к этапу D, необязательно в день 11 этапа B)	**ЭТАП C** Переход от инициирующего первого размножения к быстрому второму размножению (TIL с этапа B непосредственно переходят к этапу D в день 7/8)
ЭТАП D Второе размножение (TIL, выращенные в питательной среде, содержащей IL-2, OKT-3 и антигенпрезентирующие питающие клетки, в закрытом контейнере)	**ЭТАП D** Быстрое второе размножение (TIL, выращенные в питательной среде, содержащей IL-2, OKT-3 и 2X антигенпрезентирующих питающих клеток; в день 10–11 увеличивают масштаб и добавляют дополнительное количество IL-2)
ЭТАП E Сбор TIL с этапа D (TIL, собранные с помощью закрытой системы)	**ЭТАП E** Сбор TIL с этапа D
ЭТАП F Окончательный состав и/или перенос в инфузионный пакет (необязательно криоконсервация)	**ЭТАП F** Окончательный состав и/или перенос в инфузионный пакет (необязательно криоконсервация)

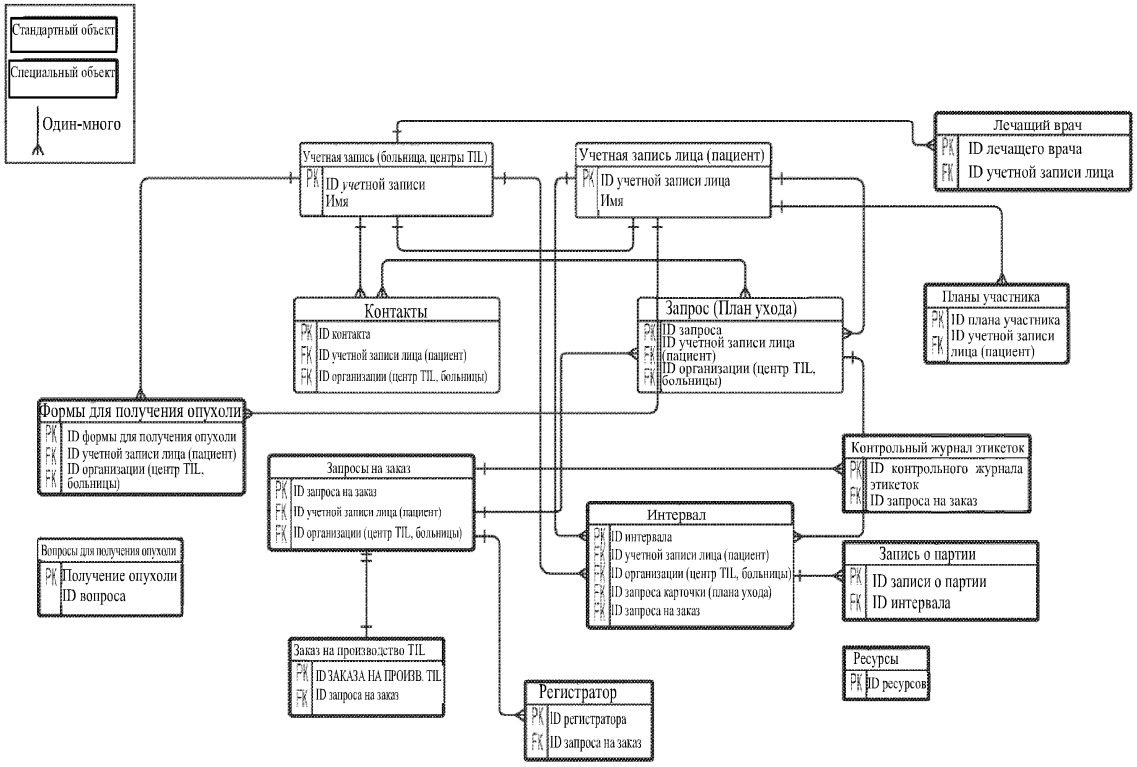
Фиг. 2B

Вариант осуществления GEN 3.0: около 14–18 дней после этапов A–E	Вариант осуществления GEN 3.1 — контроль : около 14–18 дней после этапов A–E	Вариант осуществления GEN 3.1 — тест/F: около 14–18 дней после этапов A–E
ЭТАП A Получение образца опухоли пациента (при желании можно заморозить до этапа B)	**ЭТАП A** Получение образца опухоли пациента (при желании можно заморозить до этапа B)	**ЭТАП A** Получение образца опухоли пациента (при желании можно заморозить до этапа B)
ЭТАП B Инициирующее первое размножение (физическая фрагментация вплоть до 60 фрагментов на контейнер, выращивание в течение от около 1 дня до 7–8 дней в среде, содержащей IL-2)	**ЭТАП B** Инициирующее первое размножение (физическая фрагментация вплоть до 60 фрагментов на контейнер, выращивание в течение от около 1 дня до 7–8 дней в среде, содержащей IL-2 и OKT-3)	**ЭТАП B** Инициирующее первое размножение (физическая фрагментация вплоть до 60 фрагментов на контейнер, выращивание в течение от около 1 дня до 7–8 дней в среде, содержащей IL-2, OKT-3 и антигенпрезентирующие питательные клетки)
ЭТАП C Переход от инициирующего первого размножения к быстрому второму размножению (TIL с этапа B непосредственно переходят к этапу D в день 7/8)	**ЭТАП C** Переход от инициирующего первого размножения к быстрому второму размножению (TIL с этапа B непосредственно переходят к этапу D в день 7/8)	**ЭТАП C** Переход от инициирующего первого размножения к быстрому второму размножению (TIL с этапа B непосредственно переходят к этапу D в день 7/8)
ЭТАП D Быстрое второе размножение (TIL, выращенные в питательной среде, содержащей IL-2, OKT-3 и антигенпрезентирующие питающие клетки; в день 10–11 увеличивают масштаб и добавляют дополнительное количество IL-2)	**ЭТАП D** Быстрое второе размножение (TIL, выращенные в питательной среде, содержащей IL-2, OKT-3 и 2X антигенпрезентирующих питающих клеток; в день 10–11 увеличивают масштаб и добавляют дополнительное количество IL-2)	**ЭТАП D** Быстрое второе размножение (TIL, выращенные в питательной среде, содержащей IL-2, OKT-3 и 2X антигенпрезентирующих питающих клеток; в день 10–11 увеличивают масштаб и добавляют дополнительное количество IL-2)
ЭТАП E Сбор TIL с этапа D	**ЭТАП E** Сбор TIL с этапа D	**ЭТАП E** Сбор TIL с этапа D
ЭТАП F Окончательный состав и/или перенос в инфузионный пакет (необязательно криоконсервация)	**ЭТАП F** Окончательный состав и/или перенос в инфузионный пакет (необязательно криоконсервация)	**ЭТАП F** Окончательный состав и/или перенос в инфузионный пакет (необязательно криоконсервация)

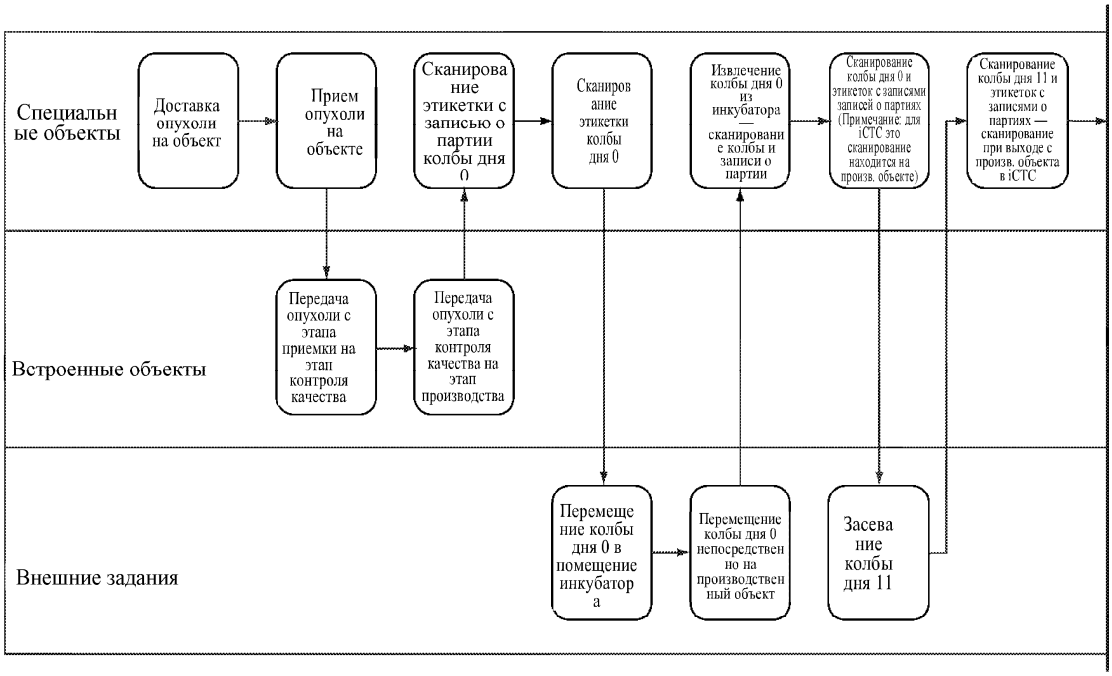
Фиг. 2C


300
БОЛЬНИЧНЫЙ ИНТЕРФЕЙС 110
МОДУЛЬ ОТСЛЕЖИВАНИЯ
112
МОДУЛЬ ПОЛУЧЕНИЯ
114
МОДУЛЬ ДОСТУПА ПАЦИЕНТА
116
МОДУЛЬ КООРДИНАЦИИ ПРОИЗВОДСТВА
118
ПРОИЗВОДСТВЕННЫЙ ПОРТАЛ 140
142
МОДУЛЬ МАРКИРОВКИ
144
МОДУЛЬ COC/COI
ПЛАНИРОВЩИК 120 СОБЫТИЙ
ВЫЧИСЛИТЕЛЬНОЕ УСТРОЙСТВО 122
МОДУЛЬ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПРИЕМЛЕМОСТИ
123
МОДУЛЬ ПЛАНИРОВАНИЯ
125
ЛОГИСТИЧЕСКИЙ ИНТЕРФЕЙС
130

Фиг. 3A

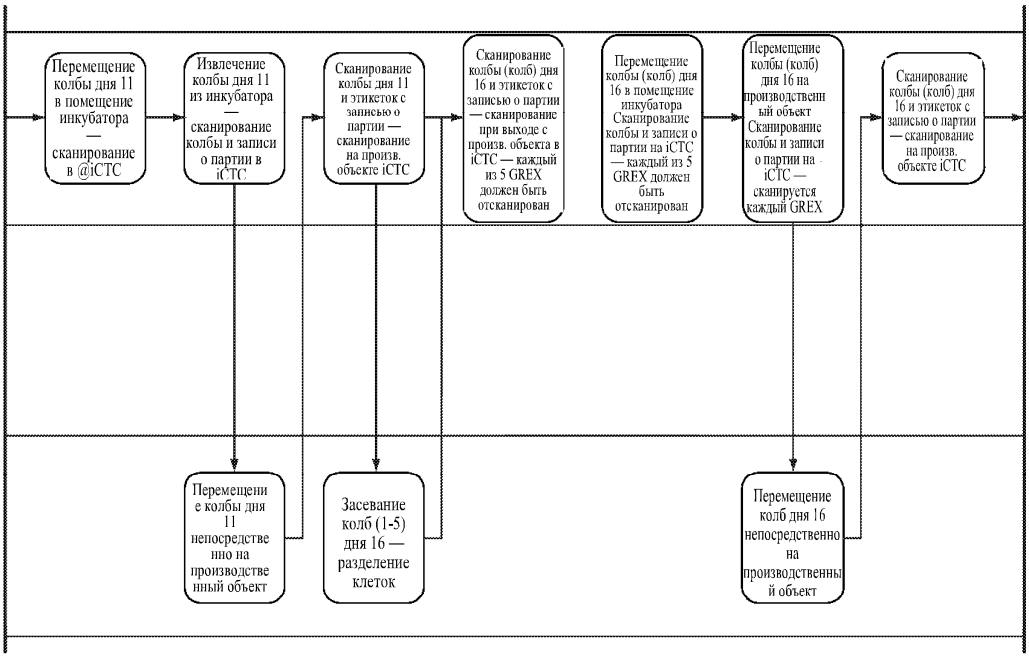


Фиг. 3B



К ФИГ. 3D

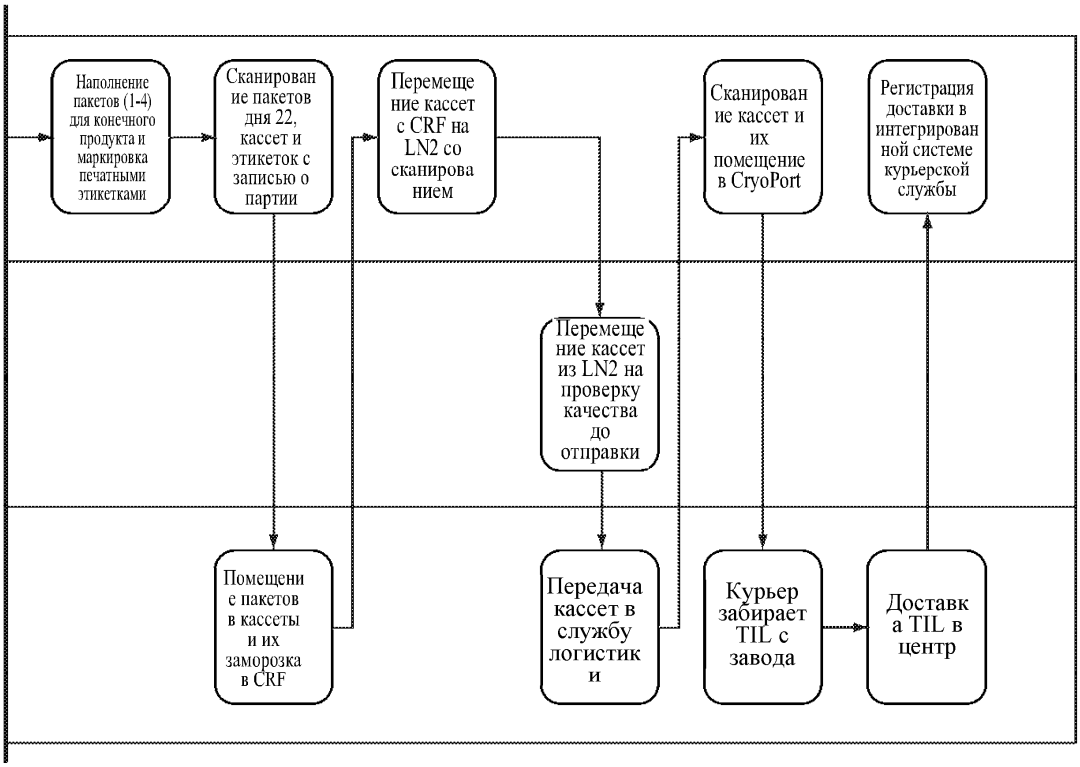
Фиг. 3C



С ФИГ. 3C

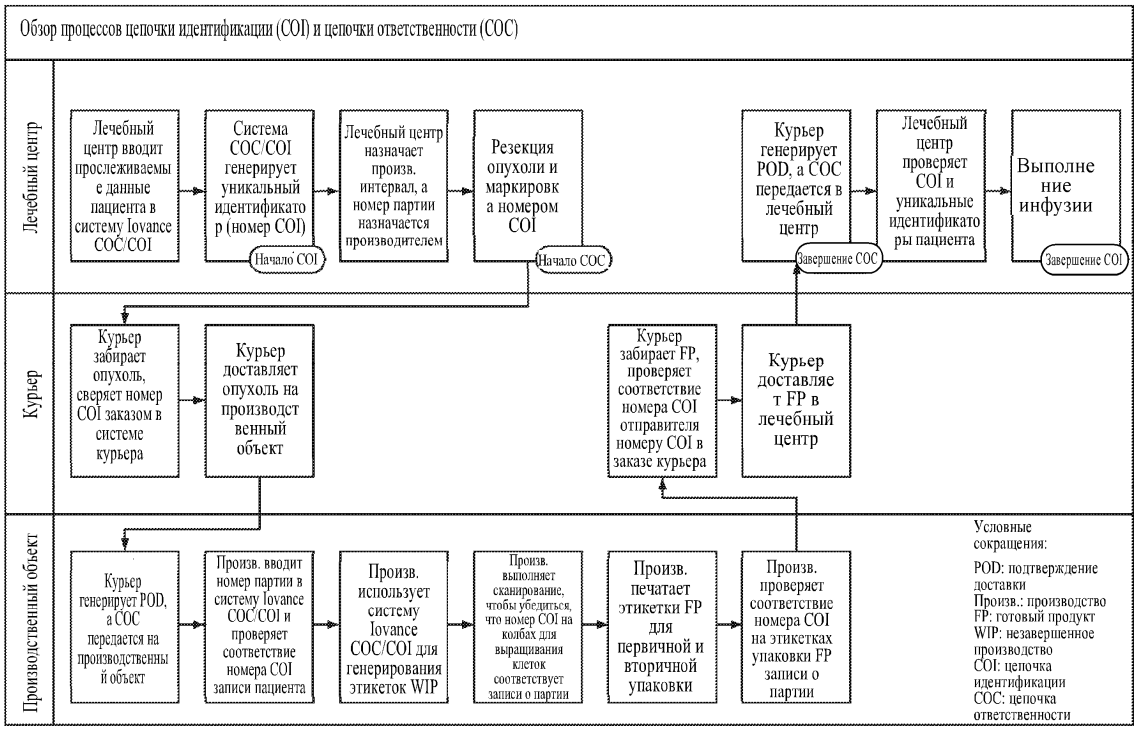
К ФИГ. 3E

Фиг. 3D

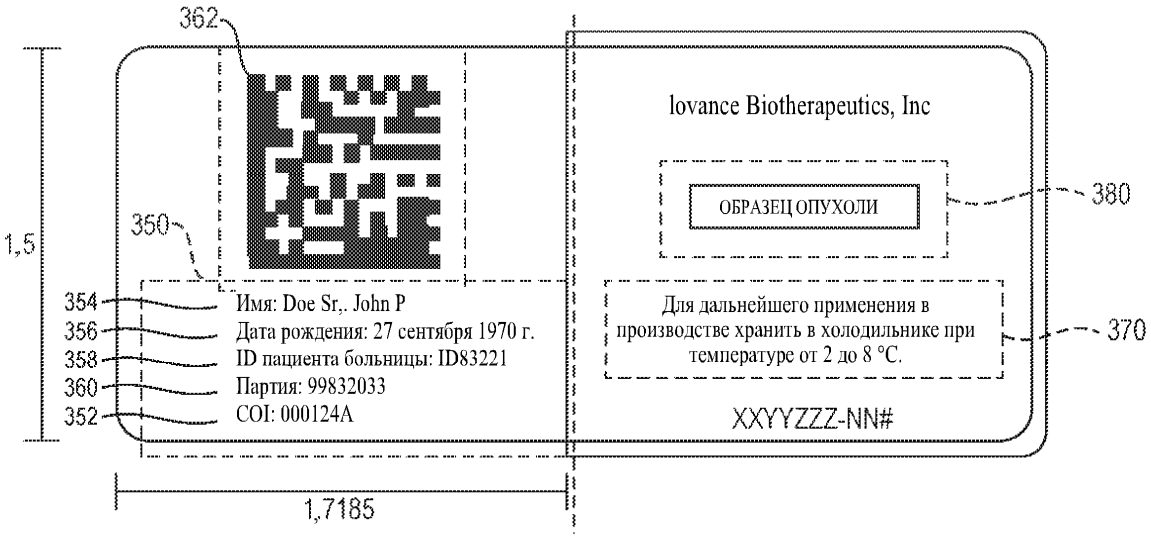


С ФИГ. 3D

Фиг. 3E


Обзор процессов цепочки идентификации (COI) и цепочки ответственности (COC)
Лечебный центр
Курьер
Производственный объект
Лечебный центр вводит прослеживаемые данные пациента в систему Iovance COC/COI
Система COC/COI генерирует уникальный идентификатор (номер COI)
Начало COI
Лечебный центр назначает произв. интервал, а номер партии назначается производителем
Резекция опухоли и маркировка номером COI
Начало COC
Курьер генерирует POD, а COC передается в лечебный центр
Завершение COC
Лечебный центр проверяет COI и уникальные идентификаторы пациента
Выполнение инфузии
Завершение COI
Курьер забирает опухоль, сверяет номер COI заказом в системе курьера
Курьер доставляет опухоль на производственный объект
Курьер забирает FP, проверяет соответствие номера COI отправителя номеру COI в заказе курьера
Курьер доставляет FP в лечебный центр
Курьер генерирует POD, а COC передается на производственный объект
Произв. вводит номер партии в систему Iovance COC/COI и проверяет соответствие номера COI записи пациента
Произв. использует систему Iovance COC/COI для генерирования этикеток WIP
Произв. выполняет сканирование, чтобы убедиться, что номер COI на колбах для выращивания клеток соответствует записи о партии
Произв. печатает этикетки FP для первичной и вторичной упаковки
Произв. проверяет соответствие номера COI на этикетках упаковки FP записи о партии
Условные сокращения:
POD: подтверждение доставки
Произв.: производство
FP: готовый продукт
WIP: незавершенное производство
COI: цепочка идентификации
COC: цепочка ответственности

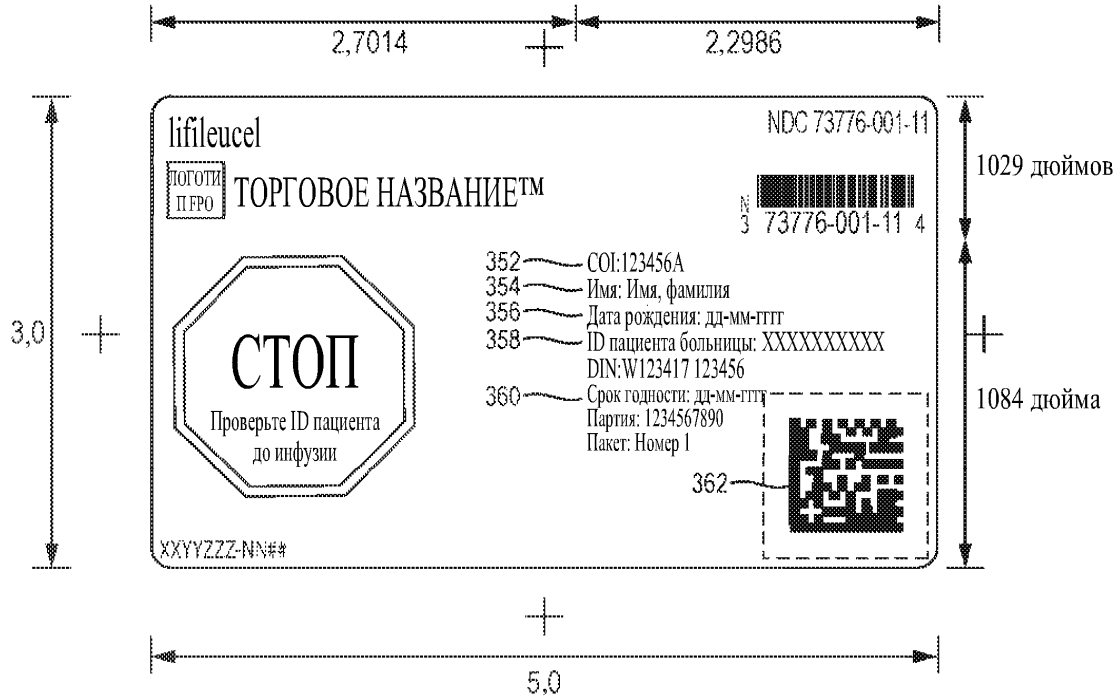
Фиг. 3F


362
1,5
350
354
356
358
360
352
Имя: Doe Sr,. John P
Дата рождения: 27 сентября 1970 г.
ID пациента больницы: ID83221
Партия: 99832033
COI: 000124A
1,7185
Iovance Biotherapeutics, Inc
ОБРАЗЕЦ ОПУХОЛИ
380
Для дальнейшего применения в производстве хранить в холодильнике при температуре от 2 до 8 °C.
370
XXYYZZZ-NN#

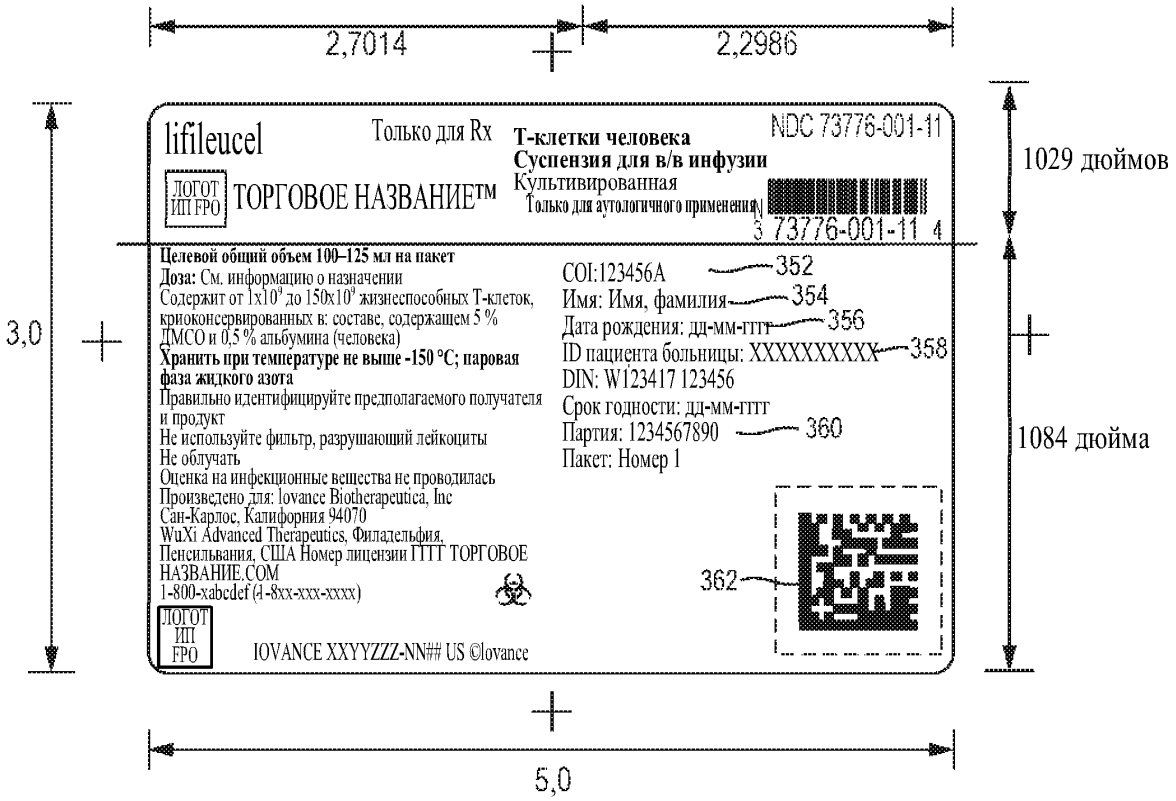
Фиг. 3G

№	Тип этикетки и тип штрих-кода	Количество	Описание
1	Отправитель опухоли	1	Этикетка необходима для доставки сырья из центра на завод
2	Флакон для среды для опухоли	1	Этикетка для флакона, в который будет помещено сырье для хранения при доставке на завод
3	В процессе производства	11	Этикетки, необходимые для колб дня 0, дня 11 и дня 16 и записи о партии
4	День 22 — пакет 1	2	Этикетки, необходимые для пакета для конечного продукта 1 и кассеты 1
5	День 22 — пакет 2	2	Этикетки, необходимые для пакета для конечного продукта 2 и кассеты 2
6	День 22 — пакет 3	2	Этикетки, необходимые для пакета для конечного продукта 3 и кассеты 3
7	День 22 — пакет 4	2	Этикетки, необходимые для пакета для конечного продукта 4 и кассеты 4
8	День 22 — партия	1	Этикетка, необходимая для записи о партии дня 22
9	Отправитель TIL	1	Этикетка, необходимая для отправки конечного продукта с завода в центр

Фиг. 3H



Фиг. 3I


2,7014
2,2986
lifileucel
Только для Rx
Т-клетки человека
Суспензия для в/в инфузии
NDC 73776-001-11
ЛОГОТ ИП FPO
ТОРГОВОЕ НАЗВАНИЕ™
Культивированная
Только для аутологичного применения
3 73776-001-11 4
Целевой общий объем 100–125 мл на пакет
Доза: См. информацию о назначении
Содержит от 1x10^9 до 150x10^9 жизнеспособных Т-клеток, криоконсервированных в: составе, содержащем 5 % ДМСО и 0,5 % альбумина (человека)
Хранить при температуре не выше -150 °C; паровая фаза жидкого азота
Правильно идентифицируйте предполагаемого получателя и продукт
Не используйте фильтр, разрушающий лейкоциты
Не облучать
Оценка на инфекционные вещества не проводилась
Произведено для: Iovance Biotherapeutics, Inc
Сан-Карлос, Калифорния 94070
WuXi Advanced Therapeutics, Филадельфия, Пенсильвания, США Номер лицензии ГТТТ ТОРГОВОЕ НАЗВАНИЕ.COM
1-800-xabcdef (1-8xx-xxx-xxxx)
ЛОГОТ ИП FPO
IOVANCE XXYYZZZ-NN## US ©Iovance
COI:123456A
352
Имя: Имя, фамилия
354
Дата рождения: дд-мм-гггг
356
ID пациента больницы: XXXXXXXXXX
358
DIN: W123417 123456
Срок годности: дд-мм-гггг
Партия: 1234567890
360
Пакет: Номер 1
362
1029 дюймов
1084 дюйма
3,0
5,0

Фиг. 3J

Главный экран **Модуль получения опухоли** **Ресурсы**

Печать TPF | Передача права собственности | Удаление права собственности

Подробная информация

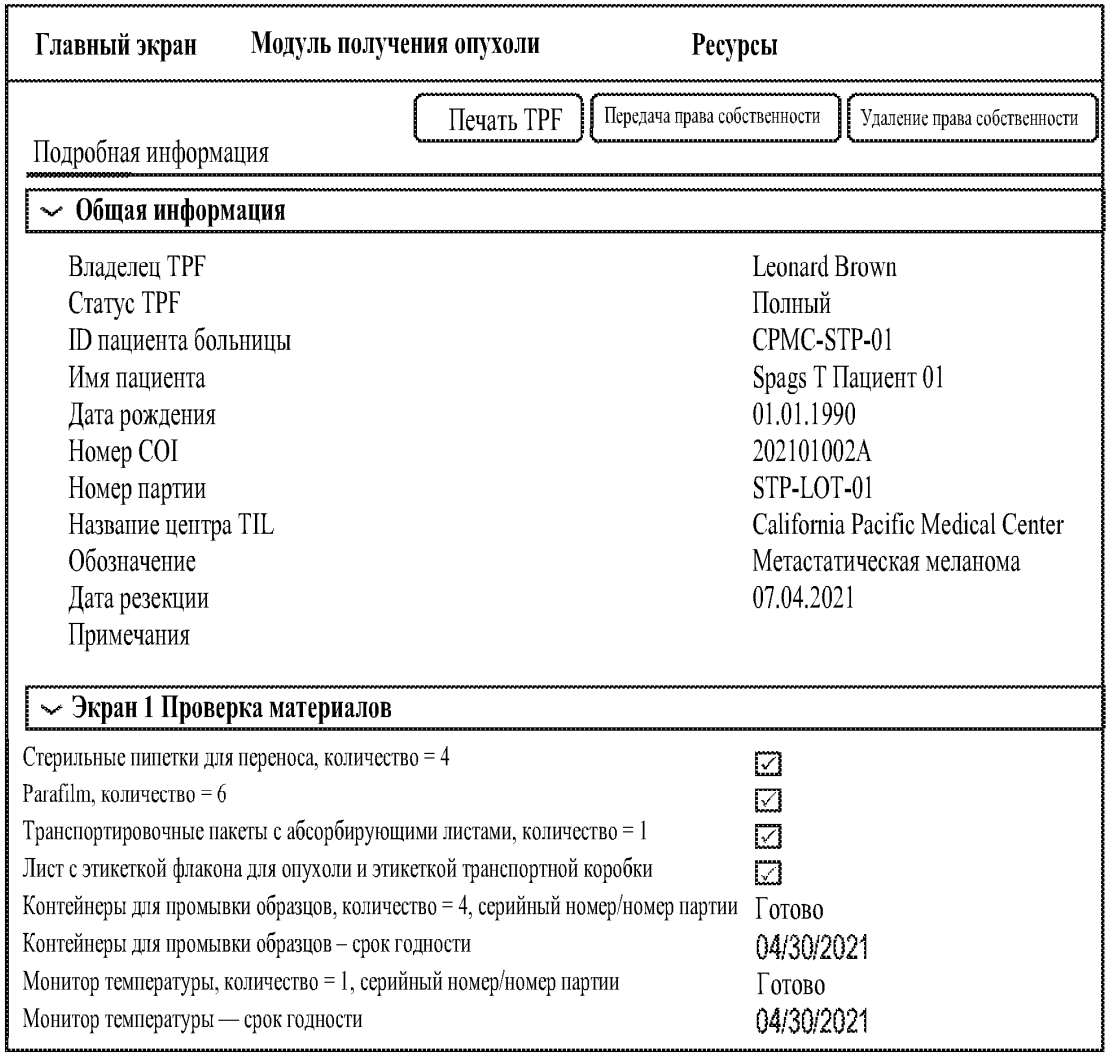
Общая информация

Владелец TPF	Leonard Brown
Статус TPF	Полный
ID пациента больницы	CPMC-STP-01
Имя пациента	Spags T Пациент 01
Дата рождения	01/01/1990
Номер COI	202101002A
Номер партии	STP-LOT-01
Центр TIL	California Pacific Medical Center
Обозначение имени	Метастатическая меланома
Дата резекции	07.04.2021
Примечания	

Экран 1 Проверка материалов

Стерильные пипетки для переноса, количество = 4	☐
Parafilm, количество = 6	☐
Транспортировочные пакеты с абсорбирующими листами, количество = 1	☐
Лист с этикеткой флакона для опухоли и этикеткой транспортной коробки	☐
Контейнеры для промывки образцов, количество = 4, серийный номер/номер партии	Готово
Контейнеры для промывки образцов – срок годности	04/30/2021
Монитор температуры, количество = 1, серийный номер/номер партии	Готово
Монитор температуры — срок годности	04/30/2021

Фиг. 3K


Главный экран
Модуль получения опухоли
Ресурсы
Печать TPF
Передача права собственности
Удаление права собственности
Подробная информация
Общая информация
Владелец TPF
Leonard Brown
Статус TPF
Полный
ID пациента больницы
CPMC-STP-01
Имя пациента
Spags T Пациент 01
Дата рождения
01.01.1990
Номер COI
202101002A
Номер партии
STP-LOT-01
Название центра TIL
California Pacific Medical Center
Обозначение
Метастатическая меланома
Дата резекции
07.04.2021
Примечания
Экран 1 Проверка материалов
Стерильные пипетки для переноса, количество = 4
Parafilm, количество = 6
Транспортировочные пакеты с абсорбирующими листами, количество = 1
Лист с этикеткой флакона для опухоли и этикеткой транспортной коробки
Контейнеры для промывки образцов, количество = 4, серийный номер/номер партии
Готово
Контейнеры для промывки образцов – срок годности
04/30/2021
Монитор температуры, количество = 1, серийный номер/номер партии
Готово
Монитор температуры — срок годности
04/30/2021

Фиг. 3L

Контейнеры для промывки образцов – срок годности	04/30/2021
Монитор температуры, количество = 1, серийный номер/номер партии	Готово
Монитор температуры — срок годности	04/30/2021
NanoCool, количество = 1 — серийный номер/номер партии	Готово
NanoCool — срок годности	04/30/2021
HBSS, количество = 1 — серийный номер/номер партии	Готово
HBSS — срок годности	04/30/2021
Гентамицин, количество = 1 — серийный номер/номер партии	Готово
Гентамицин — срок годности	04/30/2021
Амфотерицин B, количество = 1 — серийный номер / номер партии	Готово
Амфотерицин B — срок годности	04/30/2021
HypoThermosol, количество = 1 — серийный номер/номер партии	Готово
HypoThermosol — срок годности	04/30/2021
Экран 1 Подготовка материалов	
Флакон с амфотерицином B достали из морозильной камеры и разморозили.	☑
Флакон с гентамицином достали из холодильника.	☑
Во флакон с HypoThermosol добавляли 0,5 мл амфотерицина B и 0,5 мл гентамицина. Оставшиеся амфотерицин B и гентамицин, предоставленные lovance, следует утилизировать.	☑
Предоставленная lovance этикетка была проверена и нанесена на флакон с HypoThermosol. Данные пациента сверены с больничными записями. Этикетки для флаконов для образцов: ID пациента, номер COI, дата рождения	☑
Экран 1 Утверждение	
Экран 1 Подтверждение	☑
Экран 1 Подтвердил	Leonard Brown
Экран 1 Проверка	☑

Фиг. 3M

Экран 1 Подтверждение	☑
Экран 1 Подтвердил	Leonard Brown
Экран 1 Проверка	☑
Экран 1 Проверил	Cal Pacific TPV
Экран 2 Сведения о получении опухоли	
Среда, доставлена в операционную	Готово
Среда принята в операционной	Готово
Имя хирурга, выполняющего получение опухоли	Готово
Время первого получения опухоли (24 часа чч-мм)	04/07/2021 03:00
Время последнего получения опухоли (24 часа чч-мм)	04/07/2021 03:00
количество полученных поражений	1
Местоположение(-я) полученных поражений	
НАЗВАНИЕ МЕСТОПОЛОЖЕНИЯ	
Готово	
Получено ли оптимальное количество жизнеспособной опухоли диаметром по меньшей мере 1,5 см, но не более 4,0 см (в совокупности) для выделения/производства TIL?	Да
Был ли выполнен интраоперационный замороженный срез или биопсия опухоли для подтверждения наличия злокачественных клеток?	Да
Убедиться, что опухоль была промыта 3 раза в HBSS	☑
Подтвердить, что ID пациента больницы и COI совпадают с этикетками и формой для получения опухолевой ткани	☑
Время последнего помещения опухоли в HypoThermosol (24 часа чч-мм)	04/07/2021 03:00
Экран 2 Сведения о сохранении опухоли	
Убедиться, что опухоль помещена во флакон для образцов объемом 100 мл, содержащий раствор HypoThermosol/гентамицина/амфотерицина B (при 2–8 C), с плотно закрытой крышкой и обернутой Parafilm.	☑
Убедиться, что предварительно напечатанная этикетка для образца опухоли была прикреплена к	☑

Фиг. 3N

Убедиться, что опухоль помещена во флакон для образцов объемом 100 мл, содержащий раствор HypoThermosol/гентамицина/амфотерицина B (при 2–8 °C), с плотно закрытой крышкой и обернутой Parafilm.	☑
Убедиться, что предварительно напечатанная этикетка для образца опухоли была прикреплена к флакону для образца с необходимой и проверенной информацией.	☑
Убедиться, что флакон для образца помещен в транспортировочный пакет с абсорбирующими прокладками и запечатан	☑
При наличии задокументировать DIN (идентификационный номер пожертвования):	Н/Д
Экран 2 Утверждение	
Экран 2 Подтверждение	☑
Экран 2 Подтвердил	Leonard Brown
Экран 2 Проверка	☑
Экран 2 Проверил	Cal Pacific TPV
Экран 3 Сведения о распаковке опухоли	
Убедиться, что 2 охлаждающих двигателя в NanoCool активированы (обозначены голубым логотипом «NanoCool») — обычно для полной активации требуется 5 минут	☑
Убедиться, что монитор температуры совпадает с серийным номером и сроком годности, указанными в разделе 1 данной формы	☑
Убедиться, что датчик температуры активирован, и прикрепить датчик температуры к транспортировочному пакету, содержащему образец опухоли	☑
Убедиться, что транспортировочный пакет с флаконом для образца помещен в NanoCool.	☑
Проверить и прикрепить этикетки транспортировочной коробки с распечатанного листа этикеток к наружной стороне NanoCool	☑
Убедиться, что правильный курьерский коносамент (BOL) надежно прикреплен к наружной стороне NanoCool. Примечание: в правильном BOL применяется ссылочный номер, который будет соответствовать номеру COI образца пациента и номеру COI, указанному в данной форме.	☑
Убедиться, что NanoCool заклеен лентой для защиты от несанкционированного доступа.	☑

Фиг. 3O

Экран 3 Сведения о распаковке опухоли

Убедиться, что 2 охлаждающих двигателя в NanoCool активированы (обозначены голубым логотипом «NanoCool») — обычно для полной активации требуется 5 минут	☑
Убедиться, что монитор температуры совпадает с серийным номером и сроком годности, указанными в разделе 1 данной формы	☑
Убедиться, что датчик температуры активирован, и прикрепить датчик температуры к транспортировочному пакету, содержащему образец опухоли	☑
Убедиться, что транспортировочный пакет с флаконом для образца помещен в NanoCool.	☑
Проверить и прикрепить этикетки транспортировочной коробки с распечатанного листа этикеток к наружной стороне NanoCool	☑
Убедиться, что правильный курьерский коносамент (BOL) надежно прикреплен к наружной стороне NanoCool. Примечание: в правильном BOL применяется ссылочный номер, который будет соответствовать номеру COI образца пациента и номеру COI, указанному в данной форме.	☑
Убедиться, что NanoCool заклеен лентой для защиты от несанкционированного доступа.	☑
Время завершения упаковки NanoCool (24 часа чч-мм)	04/07/2021 00:00

Экран 3 Утверждение

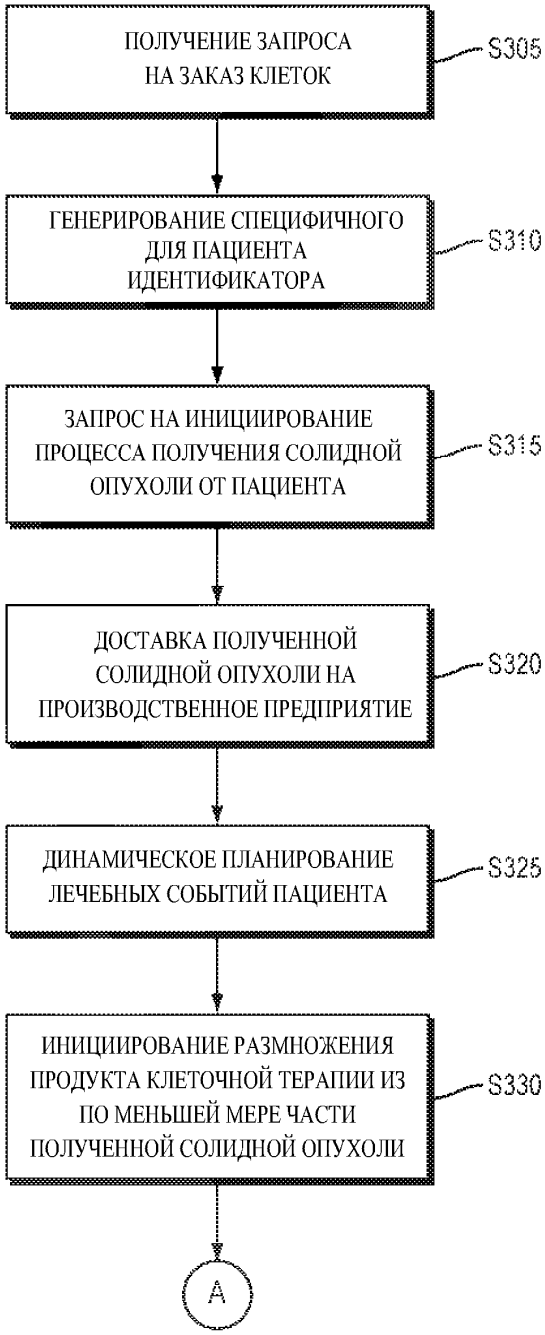
Экран 3 Подтверждение	☑
Экран 3 Подтвердил	Leonard Brown
Экран 3 Проверка	☑
Экран 3 Проверил	Cal Pacific TPV

Файлы TPF

Передать отсканированный TPF

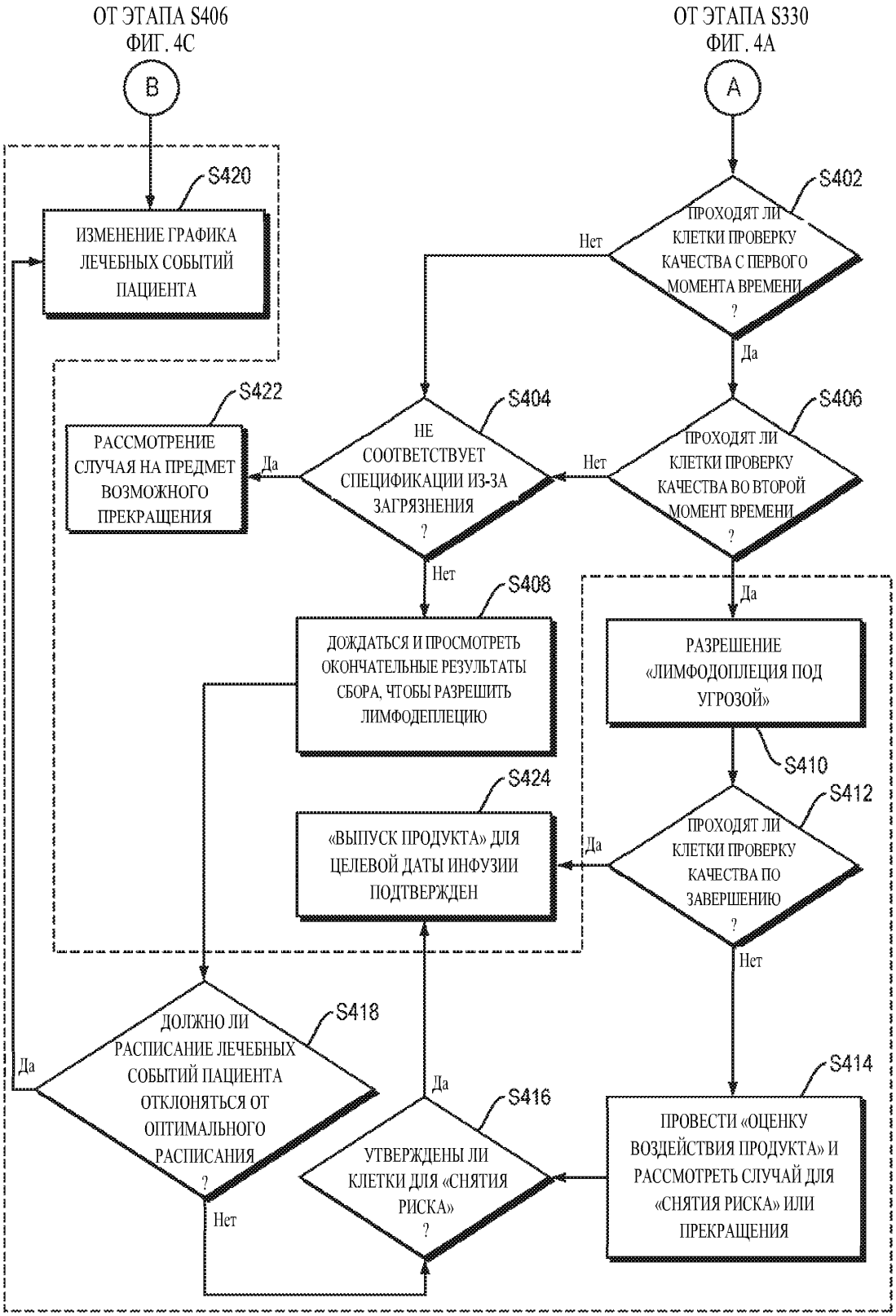
Передать файлы | Или перетащить файлы

Фиг. 3P

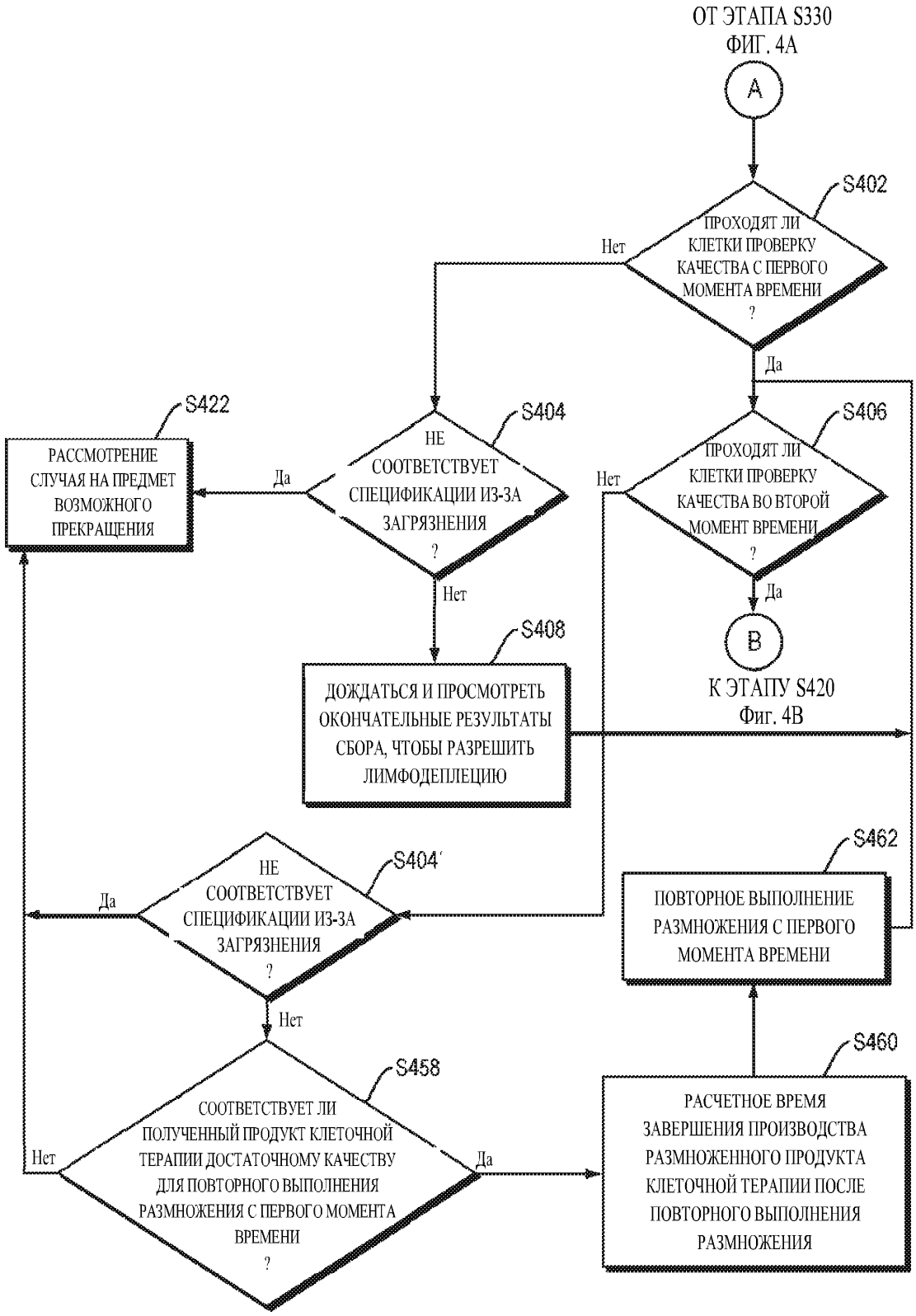


К ЭТАПУ S402
ФИГ. 4B

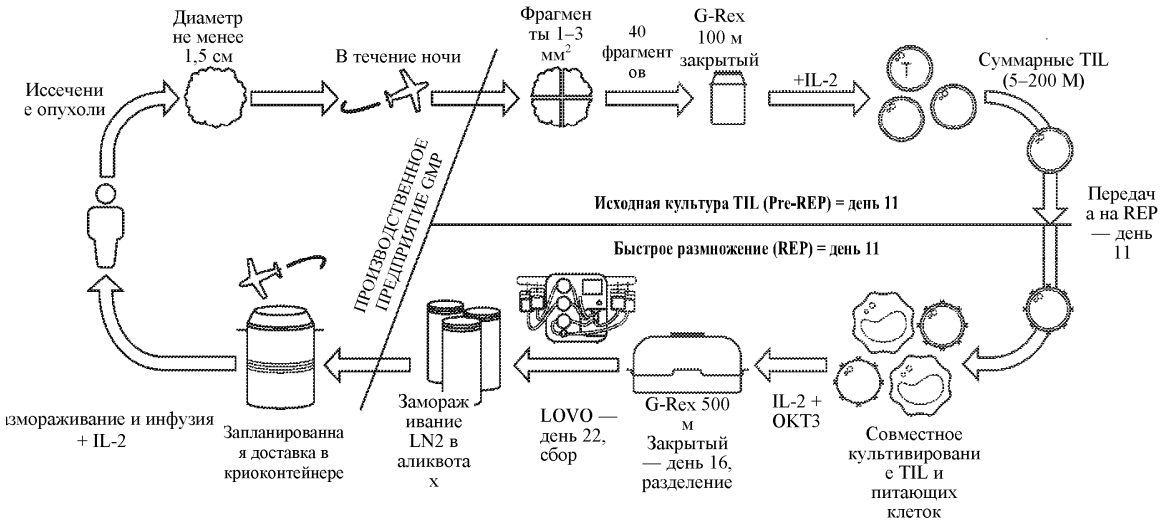
Фиг. 4A


ОТ ЭТАПА S406
ФИГ. 4С
B
ОТ ЭТАПА S330
ФИГ. 4А
A
S420
ИЗМЕНЕНИЕ ГРАФИКА ЛЕЧЕБНЫХ СОБЫТИЙ ПАЦИЕНТА
S402
ПРОХОДЯТ ЛИ КЛЕТКИ ПРОВЕРКУ КАЧЕСТВА С ПЕРВОГО МОМЕНТА ВРЕМЕНИ ?
Нет
Да
S422
РАССМОТРЕНИЕ СЛУЧАЯ НА ПРЕДМЕТ ВОЗМОЖНОГО ПРЕКРАЩЕНИЯ
Да
S404
НЕ СООТВЕТСТВУЕТ СПЕЦИФИКАЦИИ ИЗ-ЗА ЗАГРЯЗНЕНИЯ ?
Нет
S406
ПРОХОДЯТ ЛИ КЛЕТКИ ПРОВЕРКУ КАЧЕСТВА ВО ВТОРОЙ МОМЕНТ ВРЕМЕНИ ?
Нет
Да
S408
ДОЖДАТЬСЯ И ПРОСМОТРЕТЬ ОКОНЧАТЕЛЬНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ СБОРА, ЧТОБЫ РАЗРЕШИТЬ ЛИМФОДЕПЛЕЦИЮ
РАЗРЕШЕНИЕ «ЛИМФОДОПЛЕЦИЯ ПОД УГРОЗОЙ»
S410
S424
«ВЫПУСК ПРОДУКТА» ДЛЯ ЦЕЛЕВОЙ ДАТЫ ИНФУЗИИ ПОДТВЕРЖДЕН
Да
S412
ПРОХОДЯТ ЛИ КЛЕТКИ ПРОВЕРКУ КАЧЕСТВА ПО ЗАВЕРШЕНИЮ ?
Нет
S418
ДОЛЖНО ЛИ РАСПИСАНИЕ ЛЕЧЕБНЫХ СОБЫТИЙ ПАЦИЕНТА ОТКЛОНЯТЬСЯ ОТ ОПТИМАЛЬНОГО РАСПИСАНИЯ ?
Да
Нет
Да
S416
УТВЕРЖДЕНЫ ЛИ КЛЕТКИ ДЛЯ «СНЯТИЯ РИСКА» ?
S414
ПРОВЕСТИ «ОЦЕНКУ ВОЗДЕЙСТВИЯ ПРОДУКТА» И РАССМОТРЕТЬ СЛУЧАЙ ДЛЯ «СНЯТИЯ РИСКА» ИЛИ ПРЕКРАЩЕНИЯ

Фиг. 4В


ОТ ЭТАПА S330
ФИГ. 4A
A
S402
ПРОХОДЯТ ЛИ КЛЕТКИ ПРОВЕРКУ КАЧЕСТВА С ПЕРВОГО МОМЕНТА ВРЕМЕНИ ?
Нет
Да
S404
НЕ СООТВЕТСТВУЕТ СПЕЦИФИКАЦИИ ИЗ-ЗА ЗАГРЯЗНЕНИЯ ?
Да
S422
РАССМОТРЕНИЕ СЛУЧАЯ НА ПРЕДМЕТ ВОЗМОЖНОГО ПРЕКРАЩЕНИЯ
Нет
S406
ПРОХОДЯТ ЛИ КЛЕТКИ ПРОВЕРКУ КАЧЕСТВА ВО ВТОРОЙ МОМЕНТ ВРЕМЕНИ ?
Нет
Да
B
К ЭТАПУ S420
Фиг. 4B
S408
ДОЖДАТЬСЯ И ПРОСМОТРЕТЬ ОКОНЧАТЕЛЬНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ СБОРА, ЧТОБЫ РАЗРЕШИТЬ ЛИМФОДЕПЛЕЦИЮ
S462
ПОВТОРНОЕ ВЫПОЛНЕНИЕ РАЗМНОЖЕНИЯ С ПЕРВОГО МОМЕНТА ВРЕМЕНИ
S404'
НЕ СООТВЕТСТВУЕТ СПЕЦИФИКАЦИИ ИЗ-ЗА ЗАГРЯЗНЕНИЯ ?
Да
Нет
S458
СООТВЕТСТВУЕТ ЛИ ПОЛУЧЕННЫЙ ПРОДУКТ КЛЕТОЧНОЙ ТЕРАПИИ ДОСТАТОЧНОМУ КАЧЕСТВУ ДЛЯ ПОВТОРНОГО ВЫПОЛНЕНИЯ РАЗМНОЖЕНИЯ С ПЕРВОГО МОМЕНТА ВРЕМЕНИ ?
Нет
Да
S460
РАСЧЕТНОЕ ВРЕМЯ ЗАВЕРШЕНИЯ ПРОИЗВОДСТВА РАЗМНОЖЕННОГО ПРОДУКТА КЛЕТОЧНОЙ ТЕРАПИИ ПОСЛЕ ПОВТОРНОГО ВЫПОЛНЕНИЯ РАЗМНОЖЕНИЯ

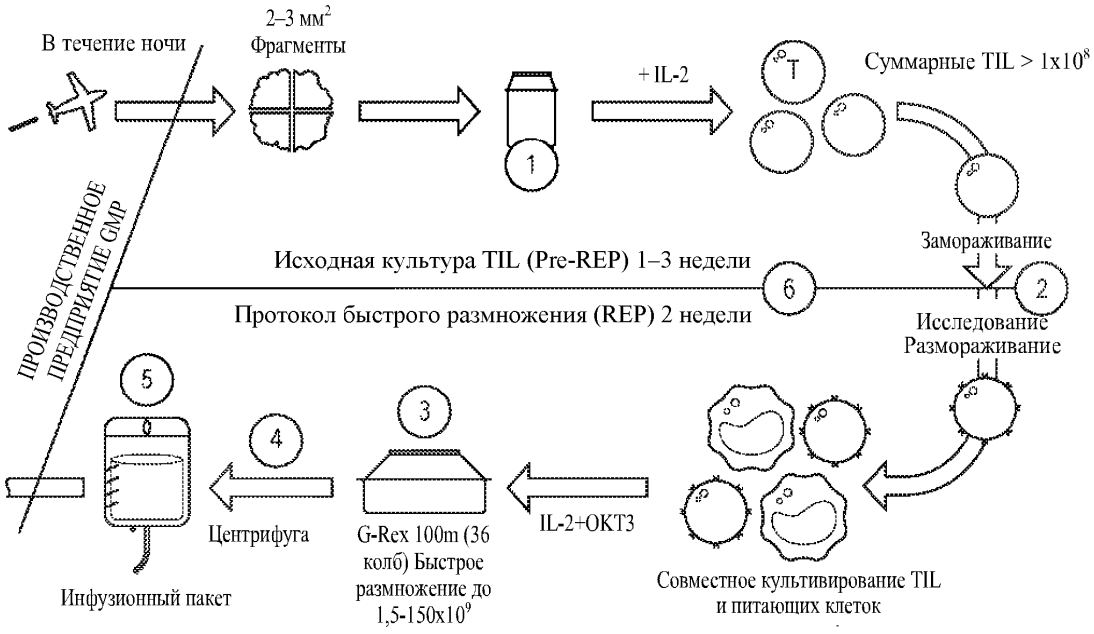
Фиг. 4C


Иссечени
е опухоли
Диаметр
не менее
1,5 см
В течение ночи
Фрагмен
ты 1–3
мм2
40
фрагмент
ов
G-Rex
100 м
закрытый
+IL-2
Суммарные TIL
(5–200 М)
Передач
а на REP
— день
11
ПРОИЗВОДСТВЕННОЕ ПРЕДПРИЯТИЕ GMP
Исходная культура TIL (Pre-REP) = день 11
Быстрое размножение (REP) = день 11
змораживание и инфузия
+ IL-2
Запланированна
я доставка в
криоконтейнере
Замораж
ивание
LN2 в
аликвота
х
LOVO —
день 22,
сбор
G-Rex 500
м
Закрытый
— день 16,
разделение
IL-2 +
OKT3
Совместное
культивировани
е TIL и
питающих
клеток

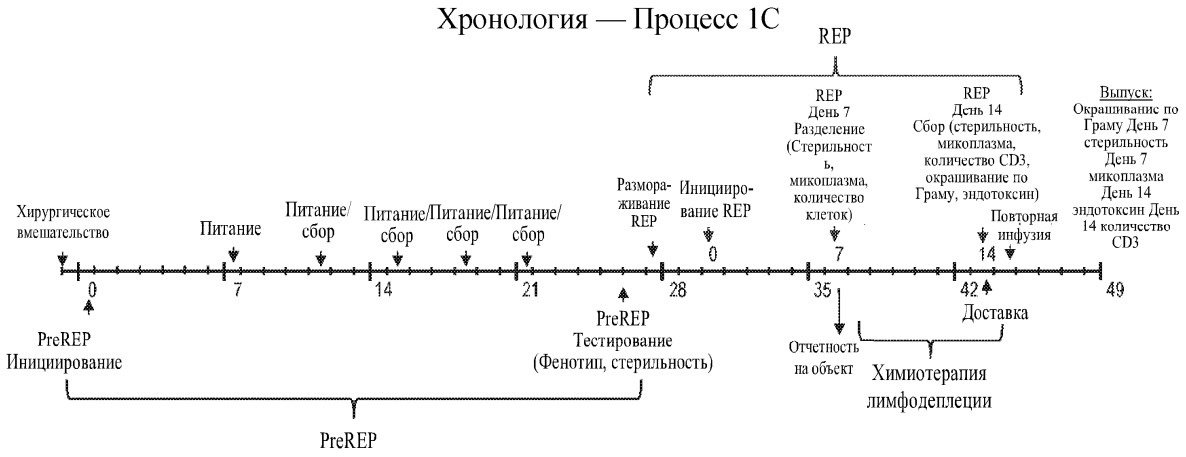
Фиг. 5

Ход процесса

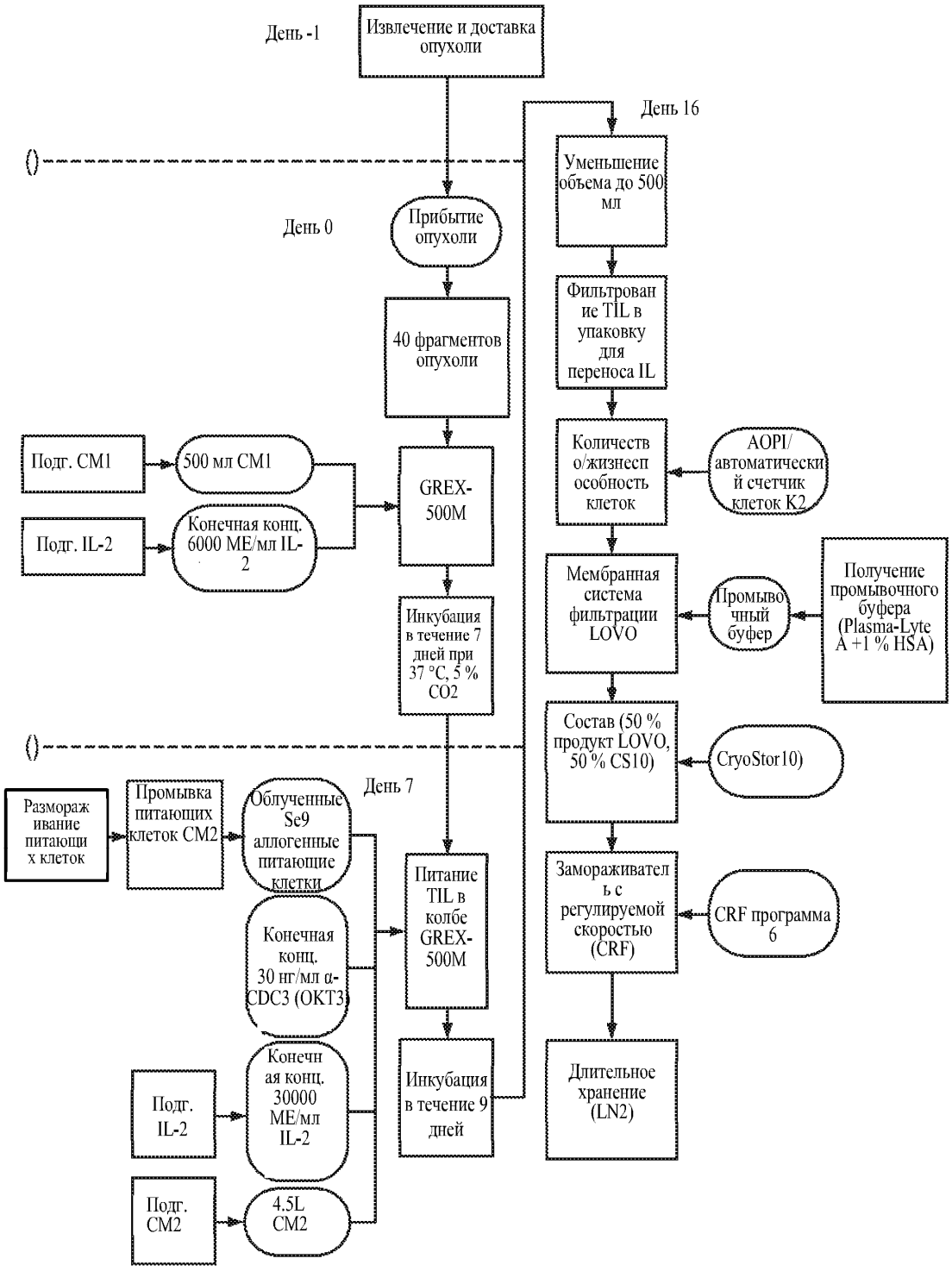
Этап	Процесс-1С	Процесс-2А	Влияние
1	4 фрагмента/10 G-Rex 10–21 день	40 фрагментов/1 G-Rex 100 CS- (x2?) 11 дней	Увеличение количества образца опухоли/контейнера, сокращение времени культивирования, сокращение количества этапов, подходит для закрытой системы
2	Замораживание PreREP-> Проверка-> Размораживание-прибл. день 27-> 40e6TIL	Передача на REP — день 11 11- <200e6	Сокращение процесса, сокращение количества этапов, устранение проверки
3	36 G-Rex 100- прибл. день 30 > 5e6TIL — разделение, - день 36	4–5 G-Rex 500CS-TIL — разделение, день 16	Сокращение количества этапов, закрытая система, сокращение REP
4	День сбора прибл. 43+ Сбор Центрифугирование	День сбора 22 LOVO-автоматическая мойка клеток	Сокращение количества этапов, автоматизированная закрытая система
5	Свежий продукт-Hypothermosol-один инфузионный пакет	Криоконсервированный продукт-CS10 в LN_2, несколько аликвот	Гибкость доставки, планирование лечебных событий пациента, более простой контроль готовой продукции, глобальные испытания
6	День 43+ времени процесса	День 22 времени процесса	Возврат к пациенту, пропускная способность чистой комнаты, COG



Фиг. 6


Хронология — Процесс 1C
REP
REP
День 7
Разделение
(Стерильность,
микоплазма,
количество
клеток)
REP
День 14
Сбор (стерильность,
микоплазма,
количество CD3,
окрашивание по
Граму, эндотоксин)
Выпуск:
Окрашивание по
Граму День 7
стерильность
День 7
микоплазма
День 14
эндотоксин День
14 количество
CD3
Хирургическое
вмешательство
Питание
Питание/
сбор
Питание/Питание/Питание/
сбор
сбор
сбор
Размора-
живание
REP
Инициро-
вание REP
Повторная
инфузия
0
7
14
21
28
35
42
49
PreREP
Инициирование
PreREP
Тестирование
(Фенотип, стерильность)
Отчетность
на объект
Доставка
Химиотерапия
лимфодеплеции
PreREP

Фиг. 7


День -1
Извлечение и доставка опухоли
День 0
Прибытие опухоли
40 фрагментов опухоли
Подг. CM1
500 мл CM1
Подг. IL-2
Конечная конц. 6000 МЕ/мл IL-2
GREX-500M
Инкубация в течение 7 дней при 37 °C, 5 % CO2
День 7
Размораживание питающих клеток
Промывка питающих клеток CM2
Облученные Se9 аллогенные питающие клетки
Конечная конц. 30 нг/мл α-CDC3 (OKT3)
Конечная конц. 30000 МЕ/мл IL-2
Подг. IL-2
Подг. CM2
4.5L CM2
Питание TIL в колбе GREX-500M
Инкубация в течение 9 дней
День 16
Уменьшение объема до 500 мл
Фильтрование TIL в упаковку для переноса IL
Количество/жизнеспособность клеток
AOPI/ автоматический счетчик клеток K2
Мембранная система фильтрации LOVO
Промывочный буфер
Получение промывочного буфера (Plasma-Lyte A +1 % HSA)
Состав (50 % продукт LOVO, 50 % CS10)
CryoStor10)
Замораживатель с регулируемой скоростью (CRF)
CRF программа 6
Длительное хранение (LN2)

Фиг. 8

Процесс 2A: около 22 дней после этапов A–E

1. ЭТАП A

Получение образца опухоли пациента

2. ЭТАП B

Фрагментация и первое размножение

от 3 дней до 14 дней

3. ЭТАП C

Переход от первого размножения ко второму размножению

Без хранения и закрытая система

4. ЭТАП D

Второе размножение

IL-2, OKT-3 и антигенпрезентирующие питающие клетки

Закрытая система

5. ЭТАП E

Сбор TIL с этапа D

Закрытая система

6. ЭТАП F

Окончательный состав и/или перенос в инфузионный пакет

(необязательно криоконсервация)

Фиг. 9

Процесс 1C: 43–55 дней для этапов A–E	**Процесс 2A:** около 22 дней после этапов A–E
1. Этап A Получение образца опухоли пациента	**1. Этап A** Получение образца опухоли пациента
2. Этап B Фрагментация и первое размножение от 11 дней до 21 дней	**2. Этап B** Фрагментация и первое размножение от 3 дней до 14 дней
3. Этап C Переход от первого размножения ко второму размножению Необязательное хранение до выбора	**3. Этап C** Переход от первого размножения ко второму размножению Без хранения и закрытая система
4. Этап D Второе размножение IL-2, OKT-3, антигенпрезентирующие питающие клетки Необязательно повторить один или более раз	**4. Этап D** Второе размножение IL-2, OKT-3, антигенпрезентирующие питающие клетки Закрытая система
5. Этап E Сбор TIL с этапа D	**5. Этап E** Сбор TIL с этапа D Закрытая система
6. Этап F Окончательный состав и/или перенос в инфузионный пакет	**6. Этап F** Окончательный состав и/или перенос в инфузионный пакет (необязательная криоконсервация)

Фиг. 10

Процесс Этап	Процесс 1C Вариант осуществления	Процесс 2A Вариант осуществления	Преимущества
Pre-REP	• 4 фрагмента на 10 колб GREX-10 • Длительность 11–21 дней	• 40 фрагментов на 1 колбу GREX-100M • Длительность 11 дней	• Увеличение количества фрагментов опухоли на колбу • Сокращение времени культивирования • Сокращение количества этапов • Подходит для закрытой системы
Переход от Pre-REP к REP	• Pre-REP TIL замораживают до фенотипирования для селекции, затем размораживают, чтобы перейти к REP (день 30). • Для REP требуется >40x10^6 TIL	• Pre-REP TIL непосредственно переходят к REP в день 11 • Для REP требуется 25–200x10^6 TIL	• Сокращенный процесс pre-REP-к-REP • Сокращение количества этапов • Исключение фенотипической селекции * Подходит для закрытой системы
REP	• 6 колб GREX-100M в день 0 REP • 5x10^6 TIL и 5x10^8 питающих клеток PBMC на колбу в день 0 REP • Разделение на 18–36 флаконов в день 7 REP • Длительность 14 дней	• 1 колба GREX-500M в день 11 • 25–200x10^6 TIL и 5x10^9 питающих клеток PBMC в день 11 • Разделение на не более 6 флаконов GREX-500M в день 16 • Длительность 11 дней	• Сокращение количества этапов • Сокращение длительности REP • Закрытая система переноса TIL между колбами • Обмен средой в закрытой системе
Сбор	• TIL, собранные центрифугированием	• TIL, собранные с помощью автоматизированной системы промывки клеток LOVO	• Сокращение количества этапов • Автоматизированная промывка клеток • Закрытая система • Уменьшение потерь продукта во время промывки
Окончательный состав	• Свежий продукт в HypoThermosol • Один инфузионный пакет • Ограниченная стабильность при транспортировке	• Криоконсервированный продукт в PlasmaLyte-A + 1 % HSA и CS10, хранящийся в LN_2 • Несколько аликвот • Долее длительная стабильность при транспортировке	• Гибкость транспортировки • Гибкое планирование лечебных событий пациента • Более оперативный контроль готовой продукции
Общее расчетное время обработки	• 43–55 дней	• 22 дня	• Более быстрый возврат к пациенту

Фиг. 11