

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202392212** (13) **A1**(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**(43) Дата публикации заявки
2023.10.06(51) Int. Cl. **A01N 1/02** (2006.01)(22) Дата подачи заявки
2022.02.09(54) **СПОСОБЫ И КОМПОЗИЦИИ ДЛЯ КРИОКОНСЕРВАЦИИ ИММУННЫХ КЛЕТОК**(31) **63/147,739; PCT/US2022/015626**

(72) Изобретатель:

(32) **2021.02.09; 2022.02.08****Чжоу Шуся, Ван Яна, Цао Лань, Гао Даюн, Сюэ Цюн, Сунь Цзюсун, Чжу Хуан (US)**(33) **US**(86) **PCT/US2022/015869**(87) **WO 2022/173866 2022.08.18**

(74) Представитель:

(71) Заявитель:

**ТАКЕДА ФАРМАСЬЮТИКАЛ
КОМПАНИ ЛИМИТЕД (JP)****Медведев В.Н. (RU)**

(57) В настоящем изобретении, помимо прочего, предложена среда для криоконсервации, содержащая криопротектор, альбумин, дисахарид и непирогенный и изотонический кристаллоидный раствор. В изобретении также предложена, среди прочего, среда для криоконсервации иммунных клеток, содержащая сывороточный альбумин человека (HSA), хлорид натрия, глюконат натрия, тригидрат ацетата натрия, хлорид калия, хлорид магния, диметилсульфоксид (ДМСО) и трегалозу. В настоящем изобретении также предложен способ криоконсервации иммунных клеток, транспортировки и последующего введения таких иммунных клеток нуждающемуся в них пациенту.

Составы для криоконсервации и результаты экспериментов in vitro с криоконсервированными CAR-NK-клетками

Состав	Получена образ	Доза	Кол-во мышей	Трансфузия/Дель образ	Композиция состава
ФСБ		НП	5	НП	ФСБ buffer
Смесь CAR-NK-клеток	Смесь CAR-NK	1X10 ⁷	5	Д6/Д25	Смесь CAR-NK-клетки в ФСБ buffer
Состав для криоконсервации №1	Прочие вещества:	1X10 ⁷	5	Д6/25	50% PLASMA-LYTE A-HEPES + 35% декстран/декстроза + 10% HSA + 5% ДМСО
Состав для криоконсервации №2	Прочие вещества:	1X10 ⁷	5	Д6/25	40% Ринста-LYTE A + 50% CS10 + 10% HSA
Состав для криоконсервации №3	Прочие вещества:	1X10 ⁷	5	Д6/25	50% MEM-HEPES + 35% декстран/декстроза + 10% HSA + 5% ДМСО
Состав для криоконсервации №4	Прочие вещества:	1X10 ⁷	5	Д6/25	40% MEM + 50% CS10 + 10% HSA
Состав для криоконсервации №5	Прочие вещества:	1X10 ⁷	5	Д6/25	38.6% Ринста-LYTE A + 50% CS10 + 10% HSA + 0.8% AA + Витамины (1 флакон 0.2% и 2 флакона 0.4%) + 30 ммоль трегалозы

A1**202392212****202392212****A1**

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-578926EA/081

СПОСОБЫ И КОМПОЗИЦИИ ДЛЯ КРИОКОНСЕРВАЦИИ ИММУННЫХ КЛЕТОК

ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННУЮ ЗАЯВКУ

[1] Настоящая заявка испрашивает приоритет предварительной заявки на патенты США с серийным номером 63/147 739, поданной 9 февраля 2021 г., и PCT/US2022/015626, поданной 8 февраля 2022 г., содержание которых включено в настоящий документ посредством ссылки в полном объеме для всех целей.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[2] В течение длительного времени замораживание клеток использовалось для сохранения живых клеток после их извлечения, забора или выделения из организма-донора или из клеточной культуры. Тем не менее, криоконсервация и восстановление живых клеток остается сложной задачей. Отчасти это объясняется тем, что клетки, подвергающиеся замораживанию и размораживанию, подвергаются воздействию неблагоприятных условий, что, в свою очередь, приводит к низкому уровню их выживаемости и/или жизнеспособности.

[3] Замораживание губительно для большинства живых клеток. По мере замораживания внеклеточной среды клетки пытаются сохранить осмотическое равновесие через мембрану, в результате чего происходит потеря внутриклеточной воды, что в свою очередь увеличивает внутриклеточную концентрацию растворенных веществ вплоть до наступления внутриклеточного замораживания. Считается, что повреждение клеток происходит из-за внутриклеточного замораживания и воздействия раствора. К таким повреждениям клеток относятся, например, повреждения плазматической мембраны клеток, которые возникают в результате осмотического обезвоживания клеток.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[4] Настоящая заявка основана, по меньшей мере частично, на обнаружении сред для криоконсервации иммунных клеток, которые обеспечивают их высокую выживаемость и/или жизнеспособность и особенно применимы для криоконсервации клеток для адоптивной терапии.

[5] В некоторых вариантах осуществления среда для криоконсервации, описанная в настоящем документе, содержит непирогенный и изотонический кристаллоидный раствор, дисахарид, криопротектор и альбумин.

[6] В различных вариантах осуществления непирогенный и изотонический кристаллоидный раствор присутствует в концентрации от 25% об./об. до 50% об./об. В некоторых вариантах осуществления непирогенный и изотонический кристаллоидный раствор присутствует в концентрации около 25%, 30%, 35%, 40%, 45% или 50%.

[7] В некоторых вариантах осуществления дисахарид выбран из группы, состоящей из сахарозы, лактозы, мальтозы, трегалозы, целлобиозы и хитобиозы. Соответственно, в некоторых вариантах осуществления дисахарид представляет собой сахарозу. В

некоторых вариантах осуществления дисахарид представляет собой лактозу. В некоторых вариантах осуществления дисахарид представляет собой целлобиозу. В некоторых вариантах осуществления дисахарид представляет собой лактозу. В некоторых вариантах осуществления дисахарид представляет собой хитобиозу. В конкретном варианте осуществления дисахарид представляет собой трегалозу.

[8] В некоторых аспектах среда для криоконсервации, представленная в настоящем документе, содержит хлорид натрия, хлорид калия, гексагидрат хлорида магния, тригидрат ацетата натрия, глюконат натрия, аденозин, декстран-40, лактобионовую кислоту, HEPES, гидроксид натрия, L-глутатион, хлорид калия, бикарбонат калия; фосфат калия, декстрозу, сахарозу, маннит, дигидрат хлорида кальция, хлорид магния, гидроксид натрия, гидроксид калия, ДМСО, сывороточный альбумин человека и трегалозу.

[9] В некоторых вариантах осуществления среда для криоконсервации, представленная в настоящем документе, содержит около 2,5% об./об. сывороточного альбумина человека (HSA). В некоторых вариантах осуществления среда для криоконсервации содержит от около 2,5% об./об. до 5,0% об./об. сывороточного альбумина человека (HSA). В некоторых вариантах осуществления среда для криоконсервации содержит от около 2,0% об./об. до 3,0% об./об. сывороточного альбумина человека (HSA).

[10] В некоторых вариантах осуществления среда для криоконсервации содержит от около 10 ммоль до 100 ммоль трегалозы. В некоторых вариантах осуществления среда для криоконсервации содержит от около 10 ммоль до 50 ммоль трегалозы. В некоторых вариантах осуществления среда для криоконсервации содержит от около 20 ммоль до 40 ммоль трегалозы. В некоторых вариантах осуществления среда для криоконсервации содержит около 30 ммоль трегалозы.

[11] В некоторых вариантах осуществления среда для криоконсервации содержит: сывороточный альбумин человека (HSA), хлорид натрия, глюконат натрия, тригидрат ацетата натрия, хлорид калия, хлорид магния, диметилсульфоксид (ДМСО) и трегалозу.

[12] В некоторых вариантах осуществления концентрация HSA составляет от около 1,25% об./об. до 15% об./об., а концентрация трегалозы - от около 10 ммоль до 100 ммоль.

[13] В некоторых вариантах осуществления концентрация HSA составляет около 10% об./об. В некоторых вариантах осуществления концентрация трегалозы составляет около 30 ммоль.

[14] В некоторых аспектах предлагается подходящая для иммунных клеток среда для криоконсервации, содержащая: PlasmaLyte-A, сывороточный альбумин человека (HSA), трегалозу и криопротектор.

[15] В некоторых вариантах осуществления криопротектор представляет собой ДМСО.

[16] В некоторых вариантах осуществления среда для криоконсервации дополнительно содержит 0-55 ммоль HEPES и 0-6% об./об. декстрана.

[17] В некоторых вариантах осуществления среда для криоконсервации

дополнительно содержит сахарный спирт, декстран, метаболит и антиоксидант.

[18] В некоторых вариантах осуществления сахарный спирт представляет собой маннит в концентрации от 0 до 100 ммоль. В некоторых вариантах осуществления маннит содержится в концентрации от около 10 до 80 ммоль. В некоторых вариантах осуществления маннит содержится в концентрации от около 20 до 70 ммоль. В некоторых вариантах осуществления маннит содержится в концентрации от около 30 до 60 ммоль.

[19] В некоторых вариантах осуществления метаболит представляет собой аденозин.

[20] В некоторых вариантах осуществления антиоксидант представляет собой глутатион.

[21] В некоторых вариантах осуществления среда подходит для криоконсервирования естественных клеток-киллеров (NK-клетки).

[22] В некоторых вариантах осуществления NK-клетки представляют собой NK-клетки, полученные из пуповинной крови или индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (иПСК). Соответственно, в некоторых вариантах осуществления NK-клетки получены из пуповинной крови. В некоторых вариантах осуществления NK-клетки представляют собой NK-клетки, полученные из иПСК.

[23] В некоторых вариантах осуществления NK-клетки представляют собой генетически сконструированные NK-клетки из пуповинной крови.

[24] В некоторых вариантах осуществления NK-клетки генетически сконструированы с химерным антигенным рецептором (CAR).

[25] В некоторых вариантах осуществления CAR связывает CD19.

[26] В некоторых вариантах осуществления генетически сконструированные NK-клетки из пуповинной крови включают в себя NK-клетки, полученные из пуповинной крови человека (CB-NK), трансдуцированные ретровирусным вектором, экспрессирующим iCaspase9, CD19-CAR и IL-15. В некоторых вариантах осуществления генетически сконструированные NK-клетки из пуповинной крови включают в себя NK-клетки, полученные из пуповинной крови человека (CB-NK), трансдуцированные невирусным вектором, экспрессирующим iCaspase9, CD19-CAR и IL-15.

[27] В некоторых вариантах осуществления генетически сконструированные NK-клетки из пуповинной крови включают в себя CD19-CAR, содержащий анти-CD19 связывающий домен, трансмембранный домен, такой как альфа-, бета- или дзета-цепь T-клеточного рецептора, CD28, CD3-эпсилон, CD45, CD4, CD5, CD8, CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137, CD154 и внутриклеточный сигнальный домен, такой как внутриклеточный сигнальный домен FcR-гамма, FcR-бета, CD3-гамма, CD3-дельта, CD3-дзета, CD3-эпсилон, CD5, CD22, CD79a, CD79b и CD66d. Домен связывания CD-19 может представлять собой одноцепочечное антитело или фрагмент одноцепочечного антитела, такой как scFv. В одном варианте осуществления анти-CD19 связывающий домен включает в себя переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 1, и/или

вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 2. В другом варианте осуществления CD-19 CAR может включать в себя анти-CD19 связывающий домен, трансмембранный домен CD28 (иллюстративная трансмембранная последовательность CD28 показана в SEQ ID NO: 3, сигнальный домен CD3z (иллюстративная последовательность CD3z показана в SEQ ID NO: 4 и может дополнительно включать в себя переключатель самоуничтожения, такой как iCaspase9 и/или IL-15.

[28] В одном варианте осуществления генетически сконструированные NK-клетки из пуповинной крови включают в себя молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую вариабельную область тяжелой цепи анти-CD19 связывающего домена и/или молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую вариабельную область легкой цепи анти-CD19 связывающего домена.

[29] В некоторых вариантах осуществления генетически сконструированные NK-клетки из пуповинной крови присутствуют в концентрации от 6 моль/мл до 120 моль/мл. В некоторых вариантах осуществления генетически сконструированные NK-клетки из пуповинной крови присутствуют в концентрации от 6 моль/мл до 200 моль/мл. В некоторых вариантах осуществления генетически сконструированные NK-клетки из пуповинной крови присутствуют в концентрации от 6 моль/мл до 25 моль/мл. В некоторых вариантах осуществления генетически сконструированные NK-клетки из пуповинной крови присутствуют в концентрации от 6 моль/мл до 120 моль/мл в среде объемом от 30 до 45 мл. В некоторых вариантах осуществления генетически сконструированные NK-клетки из пуповинной крови присутствуют в концентрации от 6 моль/мл до 200 моль/мл в среде объемом от 30 до 45 мл. В некоторых вариантах осуществления генетически сконструированные NK-клетки из пуповинной крови присутствуют в концентрации от 6 моль/мл до 25 моль/мл в среде объемом от 30 до 45 мл.

[30] В некоторых вариантах осуществления CAR-NK-клетки составляют в криоконсервированных средах, представленных в настоящем документе, в концентрации от 100 миллионов клеток до 900 миллионов клеток, находящихся в среде объемом от 30 до 45 мл. В конкретном варианте осуществления CAR-NK-клетки присутствуют в концентрации около 200 миллионов клеток в средах объемом около 36 мл. В другом варианте осуществления CAR-NK-клетки присутствуют в концентрации около 800 миллионов клеток в средах объемом около 36 мл. В некоторых вариантах осуществления клетки, находящиеся в средах объемом 36 мл, содержатся в асептическом контейнере (например, АТ-флаконе).

[31] В некоторых аспектах предлагается способ криоконсервации иммунных клеток, включающий в себя: (а) приведение иммунных клеток в контакт со средой для криоконсервации, содержащей криопротектор, альбумин, дисахарид и непирогенный и изотонический кристаллоидный раствор; (b) охлаждение клеток с регулируемой скоростью до температуры $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$; и (c) хранение клеток в паровой фазе жидкого азота, в результате чего происходит криоконсервация иммунных клеток.

[32] В некоторых вариантах осуществления иммунные клетки представляют собой NK-клетки или T-клетки.

[33] В некоторых вариантах осуществления NK-клетки являются свежeweыделенными или получены из клеточной линии.

[34] В некоторых вариантах осуществления NK-клетки получены из пуповинной крови, периферической крови, T-клеток, иПСК. Соответственно, в некоторых вариантах осуществления NK-клетки получены из пуповинной крови. В некоторых вариантах осуществления NK-клетки получены из периферической крови. В некоторых вариантах осуществления NK-клетки получены из T-клеток. В некоторых вариантах осуществления NK-клетки получены из иПСК.

[35] В конкретном варианте осуществления NK-клетки включают в себя NK-клетки, полученные из пуповинной крови человека (CB-NK), трансдуцированные ретровирусным вектором, экспрессирующим iCaspase9, CD19-CAR и IL-15. В некоторых вариантах осуществления NK-клетки включают в себя NK-клетки, полученные из пуповинной крови человека (CB-NK), трансдуцированные неретровирусным вектором, экспрессирующим iCaspase9, CD19-CAR и IL-15.

[36] В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает в себя размораживание криоконсервированных иммунных клеток (например, NK-клеток). В конкретном варианте осуществления криоконсервированные иммунные клетки представляют собой генетически сконструированные NK-клетки из пуповинной крови, содержащие CD19-CAR, включающий в себя переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 1 и/или переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 2. В другом варианте осуществления CD-19 CAR может включать в себя анти-CD19 связывающий домен, трансмембранный домен CD28 (иллюстративная трансмембранная последовательность CD28 приведена в SEQ ID NO: 3), сигнальный домен CD3z (иллюстративная последовательность CD3z приведена в SEQ ID NO: 4), и может дополнительно включать в себя переключатель самоуничтожения, такой как iCaspase9 и/или IL-15. В одном варианте осуществления генетически сконструированные NK-клетки из пуповинной крови включают в себя молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую переменную область тяжелой цепи анти-CD19 связывающего домена и/или молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую переменную область легкой цепи анти-CD19 связывающего домена.

[37] В некоторых вариантах осуществления однократно подвергнутые криоконсервации и размораживанию NK-клетки сохраняют клеточную активность и функцию, сравнимую или аналогичную свежeweыделенным NK-клеткам, которые не подвергались заморозке.

[38] В некоторых вариантах осуществления размороженные NK-клетки подходят для терапевтического применения. В конкретном варианте осуществления NK-клетки, пригодные для терапевтического применения, представляют собой CAR-NK-клетки

(например, клетки из пуповинной крови, трансдуцированные ретровирусным вектором для экспрессии iCaspase9, CD19-CAR и IL-15. В конкретном варианте осуществления НК-клетки, пригодные для терапевтического применения, представляют собой CAR-НК-клетки (например, клетки из пуповинной крови, трансдуцированные невирусным вектором для экспрессии iCaspase9, CD19-CAR и IL-15). В некоторых вариантах осуществления размораживание криоконсервированных иммунных клеток (например, НК-клеток) включает в себя: (а) нагревание водяной бани до температуры от 37 °С до 70 °С; (б) перенос контейнера с криоконсервированными иммунными клетками (например, НК-клетками) в предварительно нагретую водяную баню; и (в) перемешивание содержимого контейнера со скоростью от около 100 до около 250 об./мин в течение подходящего периода времени, что приводит к размораживанию иммунных клеток (например, НК-клеток). В некоторых вариантах осуществления температура составляет от около 55 °С до 65 °С. В некоторых вариантах осуществления скорость перемешивания составляет от около 100 до 125 об./мин. В некоторых вариантах осуществления среды для размораживания перемешивают с указанной скоростью вращения.

[39] В некоторых вариантах осуществления размораживание криоконсервированных иммунных клеток (например, НК-клеток) включает в себя: (а) нагревание устройства сухого нагрева до температуры от 37 °С до 90 °С; (б) перенос контейнера, содержащего криоконсервированные иммунные клетки (например, НК-клетки), в устройство сухого нагрева; и (в) перемешивание содержимого контейнера со скоростью от около 100 до около 250 об./мин в течение подходящего периода времени, что приводит к размораживанию иммунных клеток (например, НК-клеток). В некоторых вариантах осуществления температура составляет от около 55 °С до 65 °С. В некоторых вариантах осуществления температура составляет от около 65 °С до 90 °С. В некоторых вариантах осуществления скорость перемешивания составляет от около 100 до 125 об./мин. В некоторых вариантах осуществления среды для размораживания перемешивают с указанной скоростью вращения.

[40] В некоторых аспектах предлагается препарат клеточной терапии (например, препарат клеточной терапии CAR-НК) для применения нуждающемуся в нем субъекту, содержащий: (а) популяцию сконструированных НК-клеток, включающую НК-клетки из пуповинной крови, трансдуцированные ретровирусным вектором, экспрессирующим анти-CD19 химерный антигенный рецептор (CAR), IL-15 и iCaspase9; и (б) среду для криоконсервации, как описано в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления препарат клеточной терапии, пригодный для введения нуждающемуся в нем субъекту, включает в себя популяцию CAR-НК клеток, экспрессирующих анти-CD19 химерный антигенный рецептор (CAR), IL-15 и iCaspase9, составленных в среде для криоконсервации, содержащей криопротектор, дисахарид, альбумин, а также непиrogenный и изотонический кристаллоидный раствор, при этом популяция клеток составляет от 200 миллионов CAR-НК клеток до 800 CAR-НК клеток. В конкретном варианте осуществления препарат клеточной терапии, пригодный для применения

нуждающемуся в нем субъекту, содержит 200-800 миллионов CAR-NK клеток, экспрессирующих анти-CD19 химерный антигенный рецептор (CAR), IL-15 и iCaspase9, составленных в среде для криоконсервации, содержащей PlasmaLyte-A, трегалозу, CS10 и HSA. В некоторых аспектах предлагается популяция NK-клеток с химерным антигенным рецептором CD19 (CAR) в среде для криоконсервации, как описано в настоящем документе.

[41] В некоторых вариантах осуществления CD19-CAR NK-клетки содержат IL-15.

[42] В некоторых вариантах осуществления CD19-CAR NK-клетки содержат iCaspase9.

[43] В некоторых аспектах предлагается препарат клеточной терапии, включающий в себя популяцию CAR-NK-клеток, содержащую NK-клетки из пуповинной крови, генетически сконструированные для экспрессии CD-19 CAR, iCaspase и IL-15, составленных в среде для криоконсервации, содержащей PLASMA-LYTE A, трегалозу, CS10 и HSA.

[44] В некоторых вариантах осуществления концентрация клеток в препарате составляет от около 6 миллионов клеток/мл до 200 миллионов клеток/мл. В некоторых вариантах осуществления концентрация клеток в препарате составляет от около 6 миллионов клеток/мл до 120 миллионов клеток/мл.

[45] В некоторых вариантах осуществления общее количество жизнеспособных клеток после размораживания составляет от около 200 миллионов до около 800 миллионов клеток.

[46] Различные аспекты настоящего изобретения более подробно описаны в следующих разделах. Использование разделов не подразумевает ограничения изобретения. Каждый раздел может относиться к любому аспекту изобретения. В данной заявке применение «или» означает «и/или», если не указано иное. В контексте данного документа формы единственного числа включают в себя ссылки на формы как единственного, так и множественного числа, если из контекста явно не следует иное.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

[47] **На ФИГ. 1** представлена таблица, включающая в себя описание сред для криоконсервации и краткое описание эксперимента *in vivo* для скринингового исследования состава для криоконсервации NK-клеток с химерным антигенным рецептором (CAR) (т. е. «CAR-NK»).

[48] **На панели А ФИГ. 2** представлен график, показывающий выживаемость животных после введения им опухолевых клеток и NK-клеток, составленных в иллюстративных средах для криоконсервации, описанных в настоящем документе. **На панели В ФИГ. 2** показана серия изображений, полученных методом биоломинесцентной визуализации (BLI), демонстрирующих способность NK-клеток контролировать опухоль после их введения в мышинные модели. **На панели С ФИГ. 2** представлена медиана выживаемости животных, которым вводили NK-клетки, составленные в иллюстративных средах для криоконсервации, и результаты

статистического анализа.

[49] На панели А **ФИГ. 3** изображены иллюстративные составы для криоконсервации для второго исследования среды для криоконсервации *in vivo*. На панели В **ФИГ. 3** представлен график, изображающий кривую выживаемости (панель В), а на панели С **ФИГ. 3** представлен график, демонстрирующий контроль опухоли НК-клетками, выраженный в показателях общего потока излучения. На панели D **ФИГ. 3** представлена медиана выживаемости животных, которым вводили НК-клетки, и результаты статистического анализа. На панели Е **ФИГ. 3** представлена серия ВЛI-изображений, демонстрирующих контроль опухоли НК-клетками после их введения в мышинные модели.

[50] На **ФИГ. 4А-4D** представлена серия графиков, демонстрирующих эффективность *in vivo* НК-клеток, которые были предварительно законсервированы или составлены в виде композиции, содержащей 40% PLASMA-LYTE А+50% CS10 +10% HSA+30 ммоль трегалозы. На Фиг. 4А и Фиг. 4В представлены CAR НК-клетки от 2 разных доноров, а на Фиг. 4С и Фиг. 4D представлены CAR НК-клетки от одного и того же донора, но составленные в 2 разных контейнерах. Данные этих графиков показывают, что однократно подвергнутые криоконсервации НК-клетки от всех 3 доноров показали эффективность *in vivo*, в то время как клетки 2 из 3 доноров показали эффективность *in vivo*, сравнимую с той, которая наблюдалась при использовании свежих клеток. На **ФИГ. 4Е и 4F** представлена серия ВЛI-изображений мышей, получивших либо подвергнутые однократной заморозке НК-клетки в составе композиции, содержащей 40% PLASMA-LYTE А+50% CS10 +10% HSA+30 ммоль трегалозы, либо свежевыделенные клетки. Данные этих ВЛI исследований подтверждают эффективность *in vivo* криоконсервированных НК-клеток при использовании композиции, содержащей 40% PLASMA-LYTE А+50% CS10 +10% HSA+30 ммоль трегалозы. На **ФИГ. 4G-4I** представлена серия графиков, демонстрирующих контроль опухоли НК-клетками, выраженный в показателях общего потока излучения.

[51] На **ФИГ. 5А и 5D** представлена серия графиков, показывающих сопоставимые функции *in vitro* (т. е. % уничтожения) CAR-НК-клеток при использовании сред для криоконсервации, описанных в настоящем документе. На Фиг. 5В и 5Е представлена таблица с обобщенными данными по испытанным условиям и результатам цитотоксичности. На **ФИГ. 5С и 5F** представлены серии таблиц, демонстрирующих сопоставимый фенотип CAR-НК-клеток при использовании описанных в настоящем документе сред для криоконсервации.

[52] На **ФИГ. 6** представлена серия графиков, демонстрирующих сопоставимые параметры *in vitro* НК-клеток от 4 различных доноров, которые были приготовлены в концентрации 10 миллионов/мл в криофлаконах вместимостью 2 мл и хранились в составе композиции, содержащей 40% PLASMA-LYTE А+50% CS10 +10% HSA+30 ммоль трегалозы, по сравнению со свежими клетками.

ОПРЕДЕЛЕНИЯ

[53] Применение. В контексте настоящего документа термины «применение» или «введение» являются взаимозаменяемыми и используются в контексте доставки подвергнутых однократной заморозке клеток, представляющих интерес, или популяции таких клеток пациенту, нуждающемуся в них. В данной области известны различные способы применения клеток пациентам, включая, например, применение клеток нуждающемуся в них пациенту внутривенным или хирургическим способом.

[54] Адоптивная клеточная терапия. В контексте настоящего документа используемые взаимозаменяемо термины «адоптивная клеточная терапия», «адоптивный перенос клеток», «клеточная терапия» и «АСТ» относятся к переносу клеток, например, популяции генетически модифицированных клеток, пациенту, нуждающемуся в этом. Клетки могут быть получены от нуждающегося в них пациента и размножены (т. е. аутологичные клетки) или могут быть получены от донора, не являющегося пациентом (т. е. аллогенные клетки). В некоторых вариантах осуществления клетка представляет собой иммунную клетку, такую как лимфоцит. Для проведения АСТ могут быть использованы различные виды клеток, включая, без ограничений, естественные клетки-киллеры (НК-клетки), Т-клетки, CD8⁺ клетки, CD4⁺ клетки, дельта-гамма Т-клетки, регуляторные Т-клетки, индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (иПСК), Т-клетки, полученные из иПСК, НК-клетки, полученные из иПСК, гемопоэтические стволовые клетки (ГСК), мезенхимальные стволовые клетки (МСК) и моноклеарные клетки периферической крови. Кроме того, клетки, прошедшие криоконсервацию с использованием описанных здесь композиций и/или способов, могут быть либо генетически модифицированы до криоконсервации, либо генетически модифицированы после криоконсервации и размораживания. Клетки для адоптивной клеточной терапии, криоконсервированные с использованием композиций и способов, описанных в настоящем документе, сохраняют высокую жизнеспособность и пригодность для применения в качестве АСТ. Например, в некоторых вариантах осуществления клетки, подвергнутые криоконсервации с использованием описанных здесь способов и композиций, являются генетически модифицированными для введения химерного антигенного рецептора (CAR) после их размораживания. В качестве альтернативы, в некоторых других вариантах осуществления клетка, ранее генетически модифицированная (например, CAR-Т- или CAR-НК-клетка), может быть криоконсервирована с использованием среды для криоконсервации и/или способов, описанных в настоящем документе, и сохранить высокую выживаемость и пригодность для применения в качестве АСТ.

[55] Животное. В контексте настоящего документа термин «животное» относится к любому представителю царства животных. В некоторых вариантах осуществления «животное» относится к человеку на любой стадии развития. В некоторых вариантах осуществления «животное» относится к отличным от человека животным на любой стадии развития. В определенных вариантах осуществления отличное от человека животное представляет собой млекопитающее (например, грызуна, мышь, крысу, кролика,

обезьяну, собаку, кошку, овцу, крупный рогатый скот, примата и/или свинью). В некоторых вариантах осуществления животные включают, без ограничений, млекопитающих, птиц, рептилий, амфибий, рыб и/или червей. В некоторых вариантах осуществления животное может представлять собой трансгенное животное, генетически сконструированное животное и/или клон.

[56] Приблизительно или около. В контексте настоящего документа термин «приблизительно» или «около» применительно к одному или большему количеству представляющих интерес значений, относится к установленному значению, представляющему интерес, а также к значению, которое аналогично установленному эталонному значению. В определенных вариантах осуществления термин «приблизительно» или «около» относится к диапазону значений, которые находятся в пределах 25%, 20%, 19%, 18%, 17%, 16%, 15%, 14%, 13%, 12%, 11%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1% или менее в любую сторону (больше или меньше) от установленного эталонного значения, если не указано иное или иное не очевидно из контекста (за исключением случаев, когда такое число превышало бы 100% от возможного значения).

[57] Аллогенный. В контексте настоящего документа термин «аллогенный» относится к любому материалу, полученному от другого животного того же вида, что и индивид, которому этот материал вводится. Считается, что два или более индивидов являются аллогенными по отношению друг к другу, когда гены в одном или более локусов не являются идентичными. В некоторых аспектах аллогенный материал, полученный от индивидов одного и того же вида, может достаточно отличаться генетически для антигенного взаимодействия.

[58] Аутологичный. В контексте настоящего документа термин «аутологичный» означает происходящий от одного и того же индивида. Например, «аутологичный» по отношению к донору и реципиенту означает, что субъект-донор является субъектом-реципиентом.

[59] Химерный антигенный рецептор (CAR). В контексте настоящего документа термин «химерный антигенный рецептор» или «CAR» обозначает рецепторы, способные наделять антигенной специфичностью клетки (например, иммунные клетки, такие как NK-клетки, NK-клетки, полученные из iPSC (iNK-клетки), T-клетки, такие как наивные T-клетки, центральные T-клетки памяти, эффекторные T-клетки памяти, гамма-дельта T-клетки, T-регуляторные клетки или их комбинации). CAR также измасс.тны как искусственные T-клеточные рецепторы, химерные T-клеточные рецепторы или химерные иммунорецепторы. В различных вариантах осуществления CAR, описанный в настоящем документе, может включать в себя один или более антигенспецифический нацеливающий домен, внеклеточный домен, трансмембранный домен, в качестве варианта один или более ко-стимулирующих доменов и внутриклеточный сигнальный домен.

[60] Клетки. В контексте настоящего документа термин «клетки» относится к любым клеткам, которые могут быть подвергнуты криоконсервации. В некоторых

вариантах осуществления клетки представляют собой стволовые клетки или клетки-предшественники. В определенных вариантах осуществления клетки представляют собой соматические клетки, например, стволовые клетки взрослого человека, клетки-предшественники или дифференцированные клетки. В некоторых вариантах осуществления клетки представляют собой гемопоэтические клетки, например, гемопоэтические стволовые клетки или клетки-предшественники. В некоторых вариантах осуществления клетки включают себя В-клетки, Т-клетки, моноциты или клетки-предшественники. В некоторых вариантах осуществления клетки представляют собой NK-клетки и, в частности, CAR-NK-клетки.

[61] Регулируемое охлаждение или охлаждение с регулируемой скоростью. Термины «регулируемое охлаждение» или «охлаждение с регулируемой скоростью» и подобные термины в контексте настоящего документа обозначают процесс, в котором применяется внешний режим охлаждения, который приводит к снижению температуры биологического образца, охлаждаемого со скоростью, например, от 0,1 °C/минуту до 50 °C/минуту. В некоторых вариантах осуществления регулируемое охлаждение может быть достигнуто с помощью имеющегося в продаже замораживателя, например, замораживателя с регулируемой скоростью. Различные примеры замораживателей с регулируемой скоростью включают в себя, например, без ограничений, CryoMed™ модель 5474, CryoMed™ модель 5478, Strex CytoSensei SB02-0920, Custom BioGenic Systems модель 2101.

[62] Криоконсервация. В контексте настоящего документа термин «криоконсервация» обычно относится к замораживанию биологического материала (например, популяции клеток) до достаточно низких температур, при которых приостанавливаются химические процессы, в противном случае способные повредить материал, тем самым сохраняя материал. Криоконсервированные клетки в течение длительного периода времени сохраняют жизнеспособность в замороженном состоянии, например, в течение 1, 5, 10 или более лет в состоянии криоконсервации. Криоконсервированные клетки после размораживания способны к размножению как *in vitro*, так и *in vivo*.

[63] Криопротектор. В контексте настоящего документа термин «криопротектор» означает вещество, используемое для защиты биологической ткани от повреждения при замораживании. Иллюстративные криопротекторы включают в себя, например, диметилсульфоксид (ДМСО), глицерин, этиленгликоль и пропандиол.

[64] Кристаллоид. В контексте настоящего документа термин «кристаллоид» означает композицию, содержащую минеральные соли в водном растворе с другими водорастворимыми молекулами, такие как буферные растворы.

[65] *Ex vivo*. В контексте настоящего документа термин «*ex vivo*» означает процесс, в котором клетки извлекают из живого организма и размножают вне организма (например, в пробирке, в культуральном мешке, в биореакторе).

[66] Свежие клетки или восстановленные свежие клетки. В контексте настоящего

документа термины «свежие», «свежие клетки» или «восстановленные свежие клетки» относятся к клеткам млекопитающих, которые никогда не подвергались замораживанию и/или были подвержены однократной заморозке, но впоследствии были повторно стимулированы, культивированы в культуральной среде и получены в виде свежих клеток.

[67] Функциональный эквивалент или производное. В контексте настоящего документа термин «функциональный эквивалент» или «функциональное производное» означает функциональное производное аминокислотной последовательности или любой другой молекулы (например, компонента состава среды), которое сохраняет активность (функциональную или структурную), по существу аналогичную активности исходной молекулы или последовательности. Функциональное производное или эквивалент может быть естественным производным или получено синтетическим путем. Иллюстративные производные включают в себя производные, обладающие химико-физическими свойствами, аналогичными свойствам исходной молекулы или последовательности. Желательные сходные химико-физические свойства включают в себя сходство в заряде, объемности, гидрофобности, гидрофильности и т. п.

[68] Изотонический. В контексте настоящего документа термин «изотонический» означает, что осмотическое давление равно или приблизительно равно осмотическому давлению физиологической жидкости.

[69] *In vitro*. В контексте настоящего документа термин «*in vitro*» относится к событиям, которые происходят в искусственной среде, например, в пробирке или реакционном сосуде, в культуре клеток и т. д., а не в многоклеточном организме.

[70] *In vivo*. В контексте настоящего документа термин «*in vivo*» относится к событиям, происходящим в многоклеточном организме, таком как человек или отличное от человека животное. В контексте систем на основе клеток этот термин может использоваться для обозначения событий, происходящих внутри живой клетки (в отличие, например, от систем *in vitro*).

[71] Скрытая теплота или скрытая теплота плавления. Термины «скрытая теплота плавления» и «скрытая теплота», используемые в самом широком смысле, обозначают любое вещество или явление, в котором при приложении тепла к веществу с практически равномерной скоростью в процессе плавления достигается точка, в которой температура вещества временно перестает повышаться, в то время как тепло поглощается для изменения молекулярной структуры и внутренней энергии вещества. Во время замораживания выделение скрытого тепла при переходе из жидкого состояния в твердое повышает температуру окружающей среды, что приводит к прекращению остекловывания. В некоторых вариантах осуществления скрытая теплота плавления может вызвать таяние льда. В некоторых вариантах осуществления таяние льда приводит к увеличению концентрации сахаров, солей и криопротектора (например, ДМСО или глицерина) и, следовательно, к быстрому повышению осмотического давления незамороженной фракции. В некоторых вариантах осуществления увеличение

осмотического давления приводит к оттоку воды из клеток. В некоторых вариантах осуществления по мере охлаждения эти процессы продолжаются до тех пор, пока вязкость незамороженной фракции не станет слишком высокой для дальнейшей кристаллизации.

[72] Первичная клетка. Термин «первичная клетка» относится к клеткам, которые непосредственно выделяются из субъекта и впоследствии размножаются.

[73] Полипептид. Термин «полипептид» в контексте настоящего документа относится к последовательной цепи аминокислот, связанных друг с другом посредством пептидных связей. Этот термин используется для обозначения аминокислотной цепи любой длины, но среднему специалисту в данной области техники будет понятно, что термин не ограничен длинными цепями и может относиться к минимальной цепи, содержащей две аминокислоты, связанные друг с другом посредством пептидной связи. Как известно специалистам в данной области техники, полипептиды могут быть подвергнуты обработке и/или модификации.

[74] Белок. Термин «белок» в контексте настоящего документа относится к одному или большому количеству полипептидов, которые функционируют как дискретная единица. Если отдельный полипептид является дискретной функциональной единицей и не нуждается в постоянной или временной связи с другими полипептидами для формирования дискретной функциональной единицы, термины «полипептид» и «белок» могут использоваться взаимозаменяемо. Если дискретная функциональная единица состоит из более чем одного полипептида, физически связанных друг с другом, термин «белок» относится к множеству полипептидов, которые физически связаны и функционируют совместно как дискретная единица.

[75] Температура хранения. Термин «температура хранения» в контексте настоящего документа относится к температуре, при которой хранятся клетки. В некоторых вариантах осуществления клетки хранятся в паровой фазе жидкого азота. В некоторых вариантах осуществления клетки хранятся при температуре ниже $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$. В другом варианте осуществления клетки хранятся при температуре от $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$ до $-140\text{ }^{\circ}\text{C}$. В другом варианте осуществления клетки хранятся при температуре от $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$ до $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$. В некоторых вариантах осуществления клетки хранятся при температуре $-140\text{ }^{\circ}\text{C}$ или ниже. В некоторых вариантах осуществления клетки хранятся при температуре ниже $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$.

[76] Температура при транспортировке. Термин «температура при транспортировке» в контексте настоящего документа относится к температуре, при которой клетки перевозятся или транспортируются, например, из одного места, в котором клетки могут быть произведены и/или криоконсервированы, в другое место, где клетки могут быть разморожены и впоследствии введены нуждающемуся в них субъекту. В некоторых вариантах осуществления клетки транспортируют в паровой фазе жидкого азота. В некоторых вариантах осуществления клетки транспортируют при температуре $-140\text{ }^{\circ}\text{C}$ или ниже $-140\text{ }^{\circ}\text{C}$. В некоторых вариантах осуществления клетки хранят и/или транспортируют при температуре $-140\text{ }^{\circ}\text{C}$ или ниже $-140\text{ }^{\circ}\text{C}$.

[77] Субъект. В контексте настоящего документа термин «субъект» относится к

человеку или любому животному, отличному от человека (например, мыши, крысе, кролику, собаке, кошке, крупному рогатому скоту, свинье, овцам, лошадям или приматам). Понятие «человек» включает пре- и постнатальные формы. Во многих вариантах осуществления субъект представляет собой человека. Субъектом может быть пациент, который относится к человеку, обращающемуся в медицинское учреждение для диагностики или лечения заболевания. Термин «субъект» в контексте настоящего документа используется взаимозаменяемо с терминами «индивид» или «пациент». Субъект может быть болен или подвержен развитию заболевания или нарушения, но при этом у него могут проявляться или не проявляться симптомы заболевания или нарушения.

[78] По существу. В контексте настоящего документа термин «по существу» относится к качественному состоянию проявления полной или почти полной величины или степени характеристики или свойства, представляющего интерес. Среднему специалисту в области биологических наук будет понятно, что биологические и химические явления редко, если вообще когда-либо, доходят до завершения и/или переходят к завершению, достигают или исключают абсолютный результат. Таким образом, термин «по существу» используется в данном документе для обозначения потенциального недостатка полноты, присущего многим биологическим и химическим явлениям.

[79] Страдающий. У индивида, «страдающего» заболеванием, нарушением и/или патологическим состоянием, диагностировано или наблюдается один или несколько симптомов заболевания, нарушения и/или патологического состояния.

[80] Сахар или сахарид. Термины «сахар» и «сахарид» в настоящем документе использованы взаимозаменяемо, и в целом относятся к олигосахаридам, таким как моносахариды, дисахариды, трисахариды или полисахариды, и т. п. В некоторых вариантах осуществления сахарид представляет собой одно или более из глюкозы, ксилозы, арабинозы, фруктозы, галактозы, маннозы, маннита, сорбита, ксилита, миоинозита, трегалозы, сахарозы, лактозы, мальтозы, целлобиозы, лактита, мальтита, метилцеллюлозы, карбоксиметилцеллюлозы, декстрана, гликогена, амилозы, амилопектина, инулина, альгината натрия, этилцеллюлозы, гидроксипропилцеллюлозы, раффинозы, стахиозы, ксантановой камеди, глюкозамина и галактозамина. В некоторых вариантах осуществления сахарид представляет собой дисахарид. В некоторых вариантах осуществления дисахарид представляет собой сахарозу, лактозу, мальтозу, трегалозу, целлобиозу или хитобиозу. В некоторых других вариантах осуществления дисахарид представляет собой трегалозу. В некоторых вариантах осуществления один или более сахаров включают в себя трегалозу, сахарозу, маннит и/или декстран.

[81] Сахарный спирт. Термин «сахарный спирт» в контексте настоящего документа относится к углеводороду, имеющему от около 4 до около 8 атомов углерода и гидроксильную группу. В некоторых вариантах осуществления сахарный спирт включает в себя маннит, сорбит, инозит, галактит, дульцит, ксилит или арабит.

[82] Терапевтически эффективное количество. В контексте настоящего документа

термин «терапевтически эффективное количество» терапевтического агента означает количество, которое является достаточным при введении субъекту, страдающему или подверженному заболеванию, нарушению и/или патологическому состоянию, для лечения, диагностики, предотвращения и/или задержки проявления симптома(-ов) заболевания, нарушения и/или патологического состояния. Специалистам в данной области техники будет понятно, что терапевтически эффективное количество обычно вводят посредством схемы применения, включающей в себя по меньшей мере одну дозу. В некоторых вариантах осуществления терапевтически эффективное количество адоптивной клеточной терапии в контексте настоящего документа представляет собой дозу клеток (например, популяции генетически модифицированных иммунных клеток, таких как CAR-T или CAR-NK) в определенном составе (например, в средах для криоконсервации, описанных в настоящем документе), вводимую нуждающемуся в ней субъекту (например, пациенту, страдающему В-клеточным злокачественным новообразованием). Например, в некоторых вариантах осуществления терапевтически эффективное количество содержит CAR-NK-клетки в концентрации от 6 моль/мл до 120 моль/мл в объеме от 10 мл до 45 мл. В некоторых вариантах осуществления терапевтически эффективное количество содержит CAR-NK-клетки в концентрации от 5 моль/мл до 25 моль/мл в объеме от 10 мл до 45 мл. В некоторых вариантах осуществления терапевтически эффективное количество включает CAR-NK-клетки в количестве от около 200 миллионов клеток до около 800 миллионов клеток. В конкретном варианте осуществления CAR-NK-клетки были генетически модифицированы для экспрессии iCaspase, IL-15 и химерного антигенного рецептора CD-19.

[83] В конкретном варианте осуществления CAR-NK-клетки были генетически модифицированы для экспрессии CD-19 CAR, включающего в себя вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:2, или последовательность, обладающую по меньшей мере 95% идентичностью с последовательностью, представленной в SEQ ID NO:2, и/или вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:1, или последовательность, обладающую по меньшей мере 95% идентичностью с аминокислотной последовательностью, представленной в SEQ ID NO:1.

[84] Лечение. В контексте настоящего документа термин «лечить», «лечение» или «процесс лечения» относится к любому способу, используемому для частичного или полного облегчения, ослабления, улучшения, подавления, предотвращения, задержки проявления, уменьшения тяжести и/или уменьшения частоты возникновения одного или более симптомов или отличительных признаков конкретного заболевания, нарушения и/или патологического состояния. Лечение может быть применено субъекту, у которого нет признаков заболевания и/или выявляются только ранние признаки заболевания, с целью снижения риска развития патологических изменений, связанных с заболеванием.

[85] Перечисление числовых диапазонов по конечным точкам в настоящем документе включает в себя все числа и дроби, входящие в этот диапазон (например, от 1

до 5 включает в себя 1, 1,5, 2, 2,75, 3, 3,9, 4 и 5). Также следует понимать, что все числа и их дроби подразумеваются измененными при использовании термина «около».

[86] Различные аспекты настоящего изобретения более подробно описаны в следующих разделах. Использование разделов не подразумевает ограничения изобретения. Каждый раздел может относиться к любому аспекту изобретения. В данной заявке применение «или» означает «и/или», если не указано иное. В контексте данного документа формы единственного числа включают в себя ссылки на формы как единственного, так и множественного числа, если из контекста явно не следует иное.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Среды для криоконсервации

[87] В настоящем документе представлены различные среды, пригодные для замораживания или криоконсервирования клеток, в частности, иммунных клеток. Различные иммунные клетки включают в себя, помимо прочего, например, НК-клетки, Т-клетки (например, альфа-бета Т-клетки, гамма-дельта Т-клетки, регуляторные Т-клетки), В-клетки, МСК, ГСК, НК-клетки, полученные из ИПСК и Т-клетки, полученные из иПСК. В одном варианте осуществления клетки представляют собой НК-клетки, в частности, аллогенные НК-клетки, экспрессирующие CAR (т. е. CAR-НК-клетки).

[88] В некоторых аспектах подходящая среда для криоконсервации (т. е. среда для криоконсервации) клеток содержит: криопротектор, альбумин, дисахарид и непирогенный и изотонический кристаллоидный раствор. В различных вариантах осуществления клетки, криоконсервированные в описанных средах, могут быть разморожены и впоследствии введены пациенту без необходимости изменения повторного составления или повторного суспендирования клеток в других средах или растворе.

[89] В данной области техники известны различные криопротекторы, которые включают в себя, например, диметилсульфоксид (ДМСО), глицерин, пропандиол и другие. В некоторых вариантах осуществления среда для криоконсервации содержит ДМСО в качестве криопротектора.

[90] В некоторых вариантах осуществления сывороточный альбумин человека (HSA) представляет собой альбумин в среде для криоконсервации.

[91] В некоторых вариантах осуществления подходящая среда для криоконсервации также содержит сахарид или сахар. В других аспектах подходящая среда для криоконсервации, описанная в настоящем документе, содержит: HSA, натрий, хлорид натрия, глюконат натрия, тригидрат ацетата натрия, хлорид калия, хлорид магния, диметилсульфоксид (ДМСО) и дисахарид.

[92] В некоторых вариантах осуществления сахарид включает в себя моносахарид, дисахарид, трисахарид или полисахарид. В некоторых вариантах осуществления сахарид представляет собой дисахарид. В некоторых вариантах осуществления дисахарид представляет собой сахарозу, лактозу, мальтозу, трегалозу, целлобиозу или хитобиозу. Соответственно, в некоторых вариантах осуществления дисахарид представляет собой сахарозу. В некоторых вариантах осуществления дисахарид представляет собой лактозу. В

некоторых вариантах осуществления дисахарид представляет собой мальтозу. В некоторых других вариантах осуществления дисахарид представляет собой трегалозу. В некоторых вариантах осуществления дисахарид представляет собой целлобиозу. В некоторых вариантах осуществления дисахарид представляет собой хитобиозу.

[93] В некоторых вариантах осуществления подходящая среда для криоконсервации включает в себя один или более из глюкозы, ксилозы, арабинозы, фруктозы, галактозы, маннозы, маннита, сорбита, ксилита, миоинозита, трегалозы, сахарозы, лактозы, мальтозы, целлобиозы, лактита, мальтита, метилцеллюлозы, карбоксиметилцеллюлозы, декстрана, гликогена, амилозы, амилопектина, инулина, альгината натрия, этилцеллюлозы, гидроксипропилцеллюлозы, раффинозы, стахиозы, ксантановой камеди, глюкозамина и галактозамина. В некоторых вариантах осуществления подходящая среда для криоконсервации включает в себя трегалозу, сахарозу, маннит и/или декстран. В некоторых вариантах осуществления подходящая среда для криоконсервации включает в себя один или более сахаров, выбранных из трегалозы, сахарозы и/или маннита.

[94] В среде для криоконсервации могут быть использованы сахара различной концентрации. В некоторых вариантах осуществления среда для криоконсервации включает в себя трегалозу, сахарозу или маннит в концентрации от 0 ммоль до 500 ммоль. В некоторых вариантах осуществления среда для криоконсервации включает в себя трегалозу, сахарозу или маннитол в концентрации от 0 ммоль до 200 ммоль. В некоторых вариантах осуществления среда для криоконсервации включает в себя трегалозу, сахарозу или маннит в концентрации от 0 ммоль до 100 ммоль.

[95] В некоторых вариантах осуществления среды для криоконсервации включают в себя один или более сахаров, выбранных из трегалозы, сахарозы и/или маннита в концентрации от около 0 ммоль до 100 ммоль. В некоторых вариантах осуществления среда для криоконсервации включает в себя маннит в концентрации от около 0 до 100 ммоль.

[96] В некоторых вариантах осуществления среда для криоконсервации включает в себя трегалозу в концентрации от около 10 ммоль до 100 ммоль. В некоторых вариантах осуществления среда для криоконсервации включает в себя трегалозу в концентрации 30 ммоль.

[97] Соответственно, в некоторых вариантах осуществления трегалоза, сахароза или маннит присутствуют в среде для криоконсервации в конечной концентрации около 1 ммоль, 5 ммоль, 10 ммоль, 15 ммоль, 20 ммоль, 25 ммоль, 30 ммоль, 35 ммоль, 40 ммоль, 45 ммоль, 50 ммоль, 55 ммоль, 60 ммоль, 65 ммоль, 70 ммоль, 75 ммоль, 80 ммоль, 85 ммоль, 90 ммоль, 95 ммоль, 100 ммоль, 105 ммоль, 110 ммоль, 115 ммоль, 120 ммоль, 125 ммоль, 130 ммоль, 135 ммоль, 140 ммоль, 145 ммоль, 150 ммоль, 155 ммоль, 160 ммоль, 165 ммоль, 170 ммоль, 175 ммоль, 180 ммоль, 185 ммоль, 190 ммоль, 195 ммоль или 200 ммоль.

[98] Соответственно, в некоторых вариантах осуществления трегалоза, сахароза

или маннит присутствуют в среде для криоконсервации в конечной концентрации менее 1 ммоль, менее 10 ммоль, менее 20 ммоль, менее 30 ммоль, менее 40 ммоль, менее 50 ммоль, менее 60 ммоль, менее 70 ммоль, менее 80 ммоль, менее 90 ммоль, менее 100 ммоль, менее 110 ммоль, менее 120 ммоль, менее 130 ммоль, менее 140 ммоль, менее 150 ммоль, менее 160 ммоль, менее 170 ммоль, менее 180 ммоль, менее 190 ммоль или менее 200 ммоль.

[99] В некоторых вариантах осуществления среда для криоконсервации включает в себя декстран. В некоторых вариантах осуществления среда для криоконсервации включает в себя декстран в концентрации от около 0 до 20% масс./об. В некоторых вариантах осуществления среда для криоконсервации включает в себя декстран в концентрации от около 0 до 6% масс./об. Соответственно, в некоторых вариантах осуществления декстран присутствует в среде для криоконсервации в конечной концентрации около 0,2% масс./об, 0,4% масс./об, 0,6% масс./об, 0,8% масс./об, 1,0% масс./об, 1,5% масс./об, 2,0% масс./об, 2,5% масс./об, 3,0% масс./об, 3,5% масс./об, 4,0% масс./об, 4,5% масс./об, 5,0% масс./об, 5,5% масс./об, 6,0% масс./об, 6,5% масс./об, 7,0% масс./об, 7,5% масс./об, 8,0% масс./об, 8,5% масс./об, 9,0% масс./об, 9,5% масс./об, 10,0% масс./об, 10,5% масс./об, 11,0% масс./об, 11,5% масс./об, 12,0% масс./об, 12,5% масс./об, 13,0% масс./об, 13,5% масс./об, 14,0% масс./об, 14,5% масс./об, 15,0% масс./об, 15,5% масс./об, 16,0% масс./об, 16,5% масс./об, 17,0% масс./об, 17,5% масс./об, 18,0% масс./об, 18,5% масс./об, 19,0% масс./об, 19,5% масс./об или 20,0% масс./об.

[100] В некоторых вариантах осуществления среда для криоконсервации содержит непирогенный и изотонический кристаллоидный раствор. В среде для криоконсервации, описанной в настоящем документе, могут использоваться различные непирогенные и изотонические кристаллоидные растворы. Например, иллюстративные изотонические кристаллоидные растворы, которые могут быть использованы в описанных в настоящем документе средах для криоконсервации, включают в себя PLASMA-LYTE A, нормальный физиологический раствор, лактатный буферный раствор, ацетатный буферный раствор, ацетатный и лактатный буферный раствор, и раствор декстрозы в воде. Как правило, непирогенные и изотонические кристаллоидные растворы содержат один или более из хлорида натрия, глюконата натрия, тригидрата ацетата натрия, хлорида калия и хлорида магния. Соответственно, в некоторых вариантах осуществления среда для криоконсервации содержит один или более из хлорида натрия, глюконата натрия, тригидрата ацетата натрия, хлорида калия и хлорида магния. В некоторых вариантах осуществления среда для криоконсервации содержит один или более из хлорида натрия, глюконата натрия, тригидрата ацетата натрия, хлорида калия и хлорида магния. Примером имеющегося в продаже непирогенного и изотонического кристаллоидного раствора является PLASMA-LYTE A (Baxter International Inc.). В некоторых вариантах осуществления непирогенный и изотонический кристаллоидный раствор представляет собой PLASMA-LYTE A. В некоторых вариантах осуществления непирогенный и изотонический кристаллоидный раствор представляет собой 0,9% нормальный

физиологический раствор. В некоторых вариантах осуществления непирогенный и изотонический кристаллоидный раствор представляет собой лактатный буферный раствор. В некоторых вариантах осуществления непирогенный и изотонический кристаллоидный раствор представляет собой раствор декстрозы в воде.

[101] PLASMA-LYTE A включает в себя хлорид натрия, глюконат натрия, тригидрат ацетата натрия, хлорид калия и хлорид магния. В некоторых вариантах осуществления среда для криоконсервации включает в себя от около 10% масс./масс. до 75% масс./масс. PLASMA-LYTE A. В некоторых вариантах осуществления среда для криоконсервации включает в себя от около 25% масс./масс. до 50% масс./масс. PLASMA-LYTE A. В некоторых вариантах осуществления среда для криоконсервации включает в себя около 40% масс./масс. PLASMA-LYTE A. Соответственно, в некоторых вариантах осуществления среда для криоконсервации включает в себя около 10% масс./масс., 15% масс./масс., 20% масс./масс., 25% масс./масс., 30% масс./масс., 35% масс./масс., 40% масс./масс., 45% масс./масс., 50% масс./масс., 55% масс./масс., 60% масс./масс., 65% масс./масс., 70% масс./масс. или 75% масс./масс. PLASMA-LYTE A.

[102] В некоторых вариантах осуществления среда для криоконсервации включает в себя хлорид натрия в концентрации от около 0,1 мг/мл до около 1 мг/мл. В некоторых вариантах осуществления среда для криоконсервации включает в себя хлорид натрия в концентрации от около 0,4 мг/мл до около 0,6 мг/мл. Соответственно, в некоторых вариантах осуществления среда для криоконсервации включает в себя около 0,1 мг/мл, 0,15 мг/мл, 0,2 мг/мл, 0,25 мг/мл, 0,3 мг/мл, 0,35 мг/мл, 0,4 мг/мл, 0,45 мг/мл, 0,5 мг/мл, 0,55 мг/мл, 0,6 мг/мл, 0,65 мг/мл, 0,7 мг/мл, 0,75 мг/мл, 0,8 мг/мл, 0,85 мг/мл, 0,9 мг/мл, 0,95 мг/мл, 1 мг/мл хлорида натрия.

[103] В некоторых вариантах осуществления среда для криоконсервации включает в себя глюконат натрия в концентрации от около 0,1 мг/мл до около 1 мг/мл. В некоторых вариантах осуществления среда для криоконсервации включает в себя глюконат натрия в концентрации от около 0,3 мг/мл до около 0,6 мг/мл. Соответственно, в некоторых вариантах осуществления среда для криоконсервации включает в себя около 0,1 мг/мл, 0,15 мг/мл, 0,2 мг/мл, 0,25 мг/мл, 0,3 мг/мл, 0,35 мг/мл, 0,4 мг/мл, 0,45 мг/мл, 0,5 мг/мл, 0,55 мг/мл, 0,6 мг/мл, 0,65 мг/мл, 0,7 мг/мл, 0,75 мг/мл, 0,8 мг/мл, 0,85 мг/мл, 0,9 мг/мл, 0,95 мг/мл, 1 мг/мл глюконата натрия.

[104] В некоторых вариантах осуществления среда для криоконсервации включает в себя от около 25% масс./масс. до 75% масс./масс. CS10. В некоторых вариантах осуществления среда для криоконсервации включает в себя от около 40% масс./масс. до 60% масс./масс. CS10. В некоторых вариантах осуществления среда для криоконсервации включает в себя около 50% масс./масс. CS10. Соответственно, в некоторых вариантах осуществления CS10 присутствует в среде для криоконсервации в концентрации около 25% масс./масс., 30% масс./масс., 35% масс./масс., 40% масс./масс., 45% масс./масс., 50% масс./масс., 55% масс./масс., 60% масс./масс., 65% масс./масс., 70% масс./масс. или 75% масс./масс. CS10 имеется в продаже и включает, помимо прочего, диметилсульфоксид

(DMCO).

[105] В некоторых вариантах осуществления среда для криоконсервации содержит сывороточный альбумин человека (HSA). В некоторых вариантах осуществления среда для криоконсервации включает в себя от около 0,5% масс./масс. до 25% масс./масс. HSA. В некоторых вариантах осуществления среда для криоконсервации включает в себя от около 5% масс./масс. до 20% масс./масс. HSA. В некоторых вариантах осуществления среда для криоконсервации включает в себя около 10% масс./масс. HSA. В некоторых вариантах осуществления среда для криоконсервации включает в себя от около 1,25% масс./масс. до 5% масс./масс. HSA. В некоторых вариантах осуществления среда для криоконсервации включает в себя около 2,5% масс./масс. HSA.

[106] Соответственно, в некоторых вариантах осуществления среда для криоконсервации включает в себя около 0,5% масс./масс., 1,0% масс./масс., 1,5% масс./масс., 2,0% масс./масс., 2,5% масс./масс., 3,0% масс./масс., 3,5% масс./масс., 4,0% масс./масс., 4,5% масс./масс., 5,0% масс./масс., 6,0% масс./масс., 6,5% масс./масс., 7,0% масс./масс., 7,5% масс./масс., 8,0% масс./масс., 8,5% масс./масс., 9,0% масс./масс., 10,0% масс./масс., 10,5% масс./масс., 11,0% масс./масс., 11,5% масс./масс., 12,0% масс./масс., 12,5% масс./масс., 13,0% масс./масс., 13,5% масс./масс., 14,0% масс./масс., 14,5% масс./масс., 15,0% масс./масс., 15,5% масс./масс., 16,0% масс./масс., 16,5% масс./масс., 17,0% масс./масс., 17,5% масс./масс., 18,0% масс./масс., 18,5% масс./масс., 19,0% масс./масс., 19,5% масс./масс., 20,0% масс./масс., 20,5% масс./масс., 21,0% масс./масс., 21,5% масс./масс., 22,0% масс./масс., 22,5% масс./масс., 23,0% масс./масс., 23,5% масс./масс., 24,0% масс./масс., 24,5% масс./масс. или 25,0% масс./масс. HSA.

[107] В некоторых вариантах осуществления среда для криоконсервации содержит хлорид натрия, хлорид калия, гексагидрат хлорида магния, тригидрат ацетата натрия, глюконат натрия, аденозин, декстран-40, лактобионовую кислоту, HEPES, гидроксид натрия, L-глутатион, хлорид калия, бикарбонат калия, фосфат калия, декстрозу, сахарозу, маннит, дигидрат хлорида кальция, хлорид магния, гидроксид натрия, гидроксид калия, DMCO, сывороточный альбумин человека и трегалозу.

[108] В некоторых вариантах осуществления среда для криоконсервации содержит сывороточный альбумин человека (HSA), хлорид натрия, глюконат натрия, тригидрат ацетата натрия, хлорид калия, хлорид магния, диметилсульфоксид (DMCO) и трегалозу.

[109] В некоторых аспектах среда для криоконсервации содержит один или более из HSA, Ca^{2+} , Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , HEPES, один или более дисахаридов, сахарный спирт, декстран, метаболит и антиоксидант. В других аспектах среда для криоконсервации включает: HSA, Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , HEPES (4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинэтансульфоновая кислота) в концентрации от около 0 до 55 ммоль, один или более сахаров, выбранных из трегалозы, сахарозы и/или маннита в концентрации от около 0 до 100 ммоль, декстран в концентрации от около 0 до 6%, аденозин и глутатион. В некоторых вариантах осуществления метаболит представляет собой аденозин. В некоторых вариантах осуществления антиоксидант представляет собой глутатион.

[110] Соответственно, в некоторых вариантах осуществления HEPES присутствует в среде для криоконсервации в концентрации около 0 ммоль, 0,5 ммоль, 1 ммоль, 5 ммоль, 10 ммоль, 15 ммоль, 20 ммоль, 25 ммоль, 30 ммоль, 35 ммоль, 40 ммоль, 45 ммоль, 50 ммоль или 55 ммоль.

[111] В некоторых вариантах осуществления среда для криоконсервации содержит PLASMA-LYTE A, сывороточный альбумин человека (HSA), трегалозу и криопротектор.

[112] В некоторых вариантах осуществления среда для криоконсервации содержит сывороточный альбумин человека (HSA), PLASMA-LYTE A, дисахарид и CS10.

[113] В некоторых вариантах осуществления среда для криоконсервации содержит 35-39% PLASMA-LYTE A, 40-50% CS10, 10-20% HSA и 1-5% трегалозы.

[114] В некоторых вариантах осуществления среда для криоконсервации содержит 38,6% PLASMA-LYTE A, 50% CS10, 10% HSA и 30 ммоль трегалозы. Среда для криоконсервации может дополнительно содержать аминокислоту и/или витамины.

[115] Среды для криоконсервации, описанные в настоящем документе, могут быть составлены различными способами.

[116] В одном варианте осуществления среда для криоконсервации, описанная в настоящем документе, включает в себя использование дисахаридов, растворенного в PLASMA-LYTE A, содержащем 20% раствор HSA. В одном варианте осуществления приготовление состава осуществляется путем смешивания компонентов в следующем соотношении: 1 (основные среды) : 2 (CS10) : 1 дисахаридов в основных средах. В некоторых вариантах осуществления приготовление состава осуществляется путем смешивания компонентов в следующем соотношении: 1 (основные среды) : 2 (CS10) : 1 трегалозы в основных средах. В некоторых вариантах осуществления приготовление состава осуществляется путем смешивания компонентов в следующем соотношении: 1 (PLASMA-LYTE A) : 2 (CS10) : 1 трегалозы в основных средах.

[117] Сначала клетки суспендируют в 1 объеме предварительно кондиционированных холодных основных сред (PLASMA-LYTE A, содержащих 20% HSA) для достижения 4-кратной целевой конечной концентрации клеток, после чего медленно добавляют 2 объема предварительно кондиционированного холодного раствора CS10 при одновременном перемешивании и поддержании клеточной суспензии в холодном состоянии. В некоторых вариантах осуществления раствор трегалозы, растворенный в основных средах, добавляют в последнюю очередь для достижения целевой концентрации клеток. В некоторых вариантах осуществления клетки, как описано в настоящем документе, добавляют во флаконы с соблюдением правил асептики, после чего содержимое флаконов замораживают с помощью описанного способа замораживания.

[118] В другом варианте осуществления среда для криоконсервации, описанная в настоящем документе, содержит: базовый раствор трегалозы в воде для инъекций (WFI). В некоторых вариантах осуществления приготовление состава осуществляется путем смешивания компонентов в следующем соотношении: 1 объем основных сред и дисахаридов : 1 объем CS10. В некоторых вариантах осуществления приготовление состава

осуществляется путем смешивания компонентов в следующем соотношении: 1 объем основных сред и трегалозы : 1 объем CS10. В некоторых вариантах осуществления приготовление состава осуществляется путем смешивания компонентов в следующем соотношении: 1 объем основных сред, содержащих около 20% HSA и трегалозу : 1 объем CS10. В некоторых вариантах осуществления приготовление состава осуществляется путем смешивания компонентов в следующем соотношении: 1 объем PLASMA-LYTE A, содержащего около 20% HSA и трегалозу : 1 объем CS10.

[119] Сначала клетки суспендируют в одном объеме основных сред и трегалозы для достижения 2-кратной целевой конечной концентрации клеток, после чего добавляют равный объем CS10, перемешивая клетки и поддерживая их в холодном состоянии. В некоторых вариантах осуществления клетки, как описано в настоящем документе, добавляют во флаконы с соблюдением правил асептики, после чего содержимое флаконов замораживают с помощью описанного способа замораживания.

[120] В некоторых аспектах среда для криоконсервации подходит для криоконсервирования естественных клеток-киллеров (NK-клетки). В некоторых вариантах осуществления NK-клетки получены из первичных клеточных изолятов (например, NK-клетки, полученные из пуповинной крови). В некоторых вариантах осуществления NK-клетки происходят из клеточной линии. В некоторых вариантах осуществления NK-клетки представляют собой свежие клетки. В некоторых вариантах осуществления NK-клетки были предварительно заморожены и разморожены.

[121] В некоторых вариантах осуществления NK-клетки содержат химерный антигенный рецептор (CAR). NK-клетка может содержать любой CAR, включая, например, один или более из CD19 CAR, CAR антигена созревания B-клеток (BCMA), CAR глипикана-3 (GPC3), CD22 CAR, CAR мезотелина, MUC1 CAR, CAR молекулы адгезии эпителиальных клеток (EpcAM), CAR рецептора эпидермального фактора роста (EGFR), CD123 CAR, CD20 CAR, HER2 CAR, GD2 CAR, CD133 CAR, EphA2 CAR и CAR простатспецифического мембранного антигена (PSMA). Соответственно, в некоторых вариантах осуществления NK-клетки содержат CD19 CAR. В некоторых вариантах осуществления NK-клетки содержат BCMA CAR. В некоторых вариантах осуществления NK-клетки содержат GPC3 CAR. В некоторых вариантах осуществления NK-клетки содержат CD22 CAR. В некоторых вариантах осуществления NK-клетки содержат CAR мезотелина. В некоторых вариантах осуществления NK-клетки содержат MUC1 CAR. В некоторых вариантах осуществления NK-клетки содержат EpcAM CAR. В некоторых вариантах осуществления NK-клетки содержат EGFR CAR. В некоторых вариантах осуществления NK-клетки содержат CD123 CAR. В некоторых вариантах осуществления NK-клетки содержат CD20 CAR. В некоторых вариантах осуществления NK-клетки содержат HER2 CAR. В некоторых вариантах осуществления NK-клетки содержат GD2 CAR. В некоторых вариантах осуществления NK-клетки содержат CD133 CAR. В некоторых вариантах осуществления NK-клетки содержат EphA2 CAR. В некоторых вариантах осуществления NK-клетки содержат PSMA CAR.

[122] В некоторых вариантах осуществления NK-клетки сконструированы с возможностью экспрессии одного или более цитокинов. В некоторых вариантах осуществления NK-клетки сконструированы с возможностью экспрессии одного или более из IL-15, комплекса IL-15 и IL-15R α , IL-18, IL-12, IL-7, CCL19. Соответственно, в некоторых вариантах осуществления NK-клетки сконструированы с возможностью экспрессии IL-15. В некоторых вариантах осуществления NK-клетки сконструированы с возможностью экспрессии комплекса IL-15 и IL-15R α . В некоторых вариантах осуществления NK-клетки сконструированы с возможностью экспрессии IL-18. В некоторых вариантах осуществления NK-клетки сконструированы с возможностью экспрессии IL-12. В некоторых вариантах осуществления NK-клетки сконструированы с возможностью экспрессии IL-7. В некоторых вариантах осуществления NK-клетки сконструированы с возможностью экспрессии CCL19.

[123] В некоторых вариантах осуществления NK-клетки сконструированы с возможностью экспрессии одного или более генов самоуничтожения. Например, в некоторых примерах NK-клетки сконструированы с возможностью экспрессии одного или более из iCaspase9, несекретируемого TNF-альфа, тимидинкиназы вируса простого герпеса (HSV-TK), урацилфосфорибозилтрансферазы (UPRTase), цитозиндеаминазы (CD). Соответственно, в некоторых вариантах осуществления NK-клетки сконструированы с возможностью экспрессии одного или более из iCaspase9. В некоторых вариантах осуществления NK-клетки сконструированы с возможностью экспрессии несекретируемого TNF-альфа. В некоторых вариантах осуществления NK-клетки сконструированы с возможностью экспрессии тимидинкиназы вируса простого герпеса (HSV-TK). В некоторых вариантах осуществления NK-клетки сконструированы с возможностью экспрессии урацилфосфорибозилтрансферазы (UPRTase). В некоторых вариантах осуществления NK-клетки сконструированы с возможностью экспрессии цитозиндеаминазы (CD).

[124] В некоторых вариантах осуществления NK-клетки сконструированы с возможностью экспрессии CD19-CAR, IL-15 и iCaspase9. Пример CAR-NK клетки, содержащей CD19 IL-15 и iCaspase9, описан в публикации *Leukemia* 32 (2018)520-531, включенной в настоящий документ в полном объеме посредством ссылки.

[125] В некоторых вариантах осуществления генетически сконструированные NK-клетки из пуповинной крови включают в себя CD19-CAR, содержащий анти-CD19 связывающий домен, трансмембранный домен, такой как альфа-, бета- или дзета-цепь T-клеточного рецептора, CD28, CD3-эпсилон, CD45, CD4, CD5, CD8, CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137, CD154 и внутриклеточный сигнальный домен, такой как внутриклеточный сигнальный домен FcR-гамма, FcR-бета, CD3-гамма, CD3-дельта, CD3-дзета, CD3-эпсилон, CD5, CD22, CD79a, CD79b и CD66d. Домен связывания CD-19 может представлять собой одноцепочечное антитело или фрагмент одноцепочечного антитела, такой как scFv. В одном варианте осуществления анти-CD19 связывающий домен включает в себя переменную область легкой цепи, содержащую

аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 1, и/или переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 2. В другом варианте осуществления CD-19 CAR может включать в себя анти-CD19 связывающий домен, трансмембранный домен CD28 (иллюстративная трансмембранная последовательность CD28 показана в SEQ ID NO: 3, сигнальный домен CD3z (иллюстративная последовательность CD3z показана в SEQ ID NO: 4 и может дополнительно включать в себя переключатель самоуничтожения, такой как iCaspase9 и/или IL-15.

[126] В одном варианте осуществления генетически сконструированные NK-клетки из пуповинной крови включают в себя молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую переменную область тяжелой цепи анти-CD19 связывающего домена и/или молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую переменную область легкой цепи анти-CD19 связывающего домена.

[127] В некоторых вариантах осуществления среда для криоконсервации, описанная в настоящем документе, содержит CAR-NK-клетки в концентрации от 6 моль/мл до 120 моль/мл. В некоторых вариантах осуществления среда для криоконсервации, описанная в настоящем документе, содержит CAR-NK-клетки в концентрации от 6 моль/мл до 200 моль/мл. В некоторых вариантах осуществления среда для криоконсервации содержит CAR-NK-клетки в концентрации от 5 моль/мл до 25 моль/мл. В некоторых вариантах осуществления среда для криоконсервации, описанная в настоящем документе, содержит CAR-NK-клетки в концентрации от 6 моль/мл до 120 моль/мл в объеме 36 мл. В некоторых вариантах осуществления среда для криоконсервации, описанная в настоящем документе, содержит CAR-NK-клетки в концентрации от 6 моль/мл до 200 моль/мл в объеме 36 мл. В некоторых вариантах осуществления среда для криоконсервации содержит CAR-NK-клетки в концентрации от 5 моль/мл до 25 моль/мл в объеме 36 мл.

[128] В некоторых вариантах осуществления общий объем среды для криоконсервации, в которой суспендированы CAR-NK-клетки, составляет от около 15 мл до 30 мл, от около 30 мл до 45 мл, от около 30 мл до 60 мл или от около 30 мл до 75 мл. Соответственно, в некоторых вариантах осуществления общий объем, в котором суспендированы NK-клетки, составляет от около 15 мл до 30 мл. В некоторых вариантах осуществления общий объем, в котором суспендированы CAR-NK-клетки, составляет от около 30 мл до 45 мл. В некоторых вариантах осуществления общий объем, в котором суспендированы CAR-NK-клетки, составляет от около 30 мл до 60 мл. В некоторых вариантах осуществления общий объем, в котором суспендированы CAR-NK-клетки, составляет от около 30 мл до 75 мл. В некоторых вариантах осуществления общий объем, в котором суспендированы CAR-NK-клетки, составляет около 20 мл, 21 мл, 22 мл, 23 мл, 24 мл, 25 мл, 26 мл, 27 мл, 28 мл, 29 мл, 30 мл, 31 мл, 32 мл, 33 мл, 34 мл, 35 мл, 36 мл, 37 мл, 38 мл, 39 мл, 40 мл, 41 мл, 42 мл, 43 мл, 44 мл, 45 мл, 46 мл, 47 мл, 48 мл, 49 мл или 50 мл. В некоторых вариантах осуществления общий объем, в котором суспендированы

[129] В некоторых вариантах осуществления CAR-NK-клетки после размораживания находятся в концентрации от 200 миллионов до 800 миллионов клеток на 36 мл. В некоторых вариантах осуществления среда для криоконсервации содержит CAR-NK-клетки в концентрации от около 100 до 1000 миллионов CAR-NK-клеток на объем наполнения в 36 мл. В некоторых вариантах осуществления среда для криоконсервации содержит CAR-NK-клетки в концентрации от около 200 до 800 миллионов клеток на объем наполнения в 36 мл. В некоторых вариантах осуществления среда для криоконсервации содержит CAR-NK-клетки в концентрации около 100 миллионов клеток на объем наполнения в 36 мл. В некоторых вариантах осуществления среда для криоконсервации содержит CAR-NK-клетки в концентрации около 200 миллионов клеток на объем наполнения в 36 мл. В некоторых вариантах осуществления среда для криоконсервации содержит CAR-NK-клетки в концентрации около 300 миллионов клеток на объем наполнения в 36 мл. В некоторых вариантах осуществления среда для криоконсервации содержит CAR-NK-клетки в концентрации около 400 миллионов клеток на объем наполнения в 36 мл. В некоторых вариантах осуществления среда для криоконсервации содержит CAR-NK-клетки в концентрации около 500 миллионов клеток на объем наполнения в 36 мл. В некоторых вариантах осуществления среда для криоконсервации содержит CAR-NK-клетки в концентрации около 600 миллионов клеток на объем наполнения в 36 мл. В некоторых вариантах осуществления среда для криоконсервации содержит CAR-NK-клетки в концентрации около 700 миллионов клеток на объем наполнения в 36 мл. В некоторых вариантах осуществления среда для криоконсервации содержит CAR-NK-клетки в концентрации около 800 миллионов клеток на объем наполнения в 36 мл. В некоторых вариантах осуществления среда для криоконсервации содержит CAR-NK-клетки в концентрации около 1000 миллионов клеток на объем наполнения в 36 мл.

[130] В некоторых вариантах осуществления препарат CAR-NK-клеточной терапии подвергают криоконсервации с использованием среды для криоконсервации, описанной в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления препарат CAR-NK-клеточной терапии представляет собой препарат аллогенной клеточной терапии, содержащий NK-клетки, полученные из пуповинной крови человека, трансдуцированные ретровирусным вектором, экспрессирующим iCaspase9, CD-19 CAR и IL-15.

[131] В некоторых вариантах осуществления NK-клетки включают в себя препарат для CAR-NK-клеточной терапии, содержащий популяцию клеток в количестве от 1×10^6 до 5×10^9 , составленных в среде для криоконсервации, описанных в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления NK-клетки включают в себя препарат CAR-NK-клеточной терапии, содержащий популяцию клеток в количестве от 2×10^6 до 800×10^6 , составленную в средах для криоконсервации, описанных в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления препарат CAR-NK-клеточной терапии представляет собой препарат аллогенной клеточной терапии, содержащий от 200×10^6 до 800×10^6 NK-клеток, полученных из пуповинной крови человека, трансдуцированных ретровирусным

вектором, экспрессирующим iCaspase9, CD-19 CAR и IL-15, и составленных в 36 мл среды для криоконсервации, содержащей ДМСО, трегалозу, PLASMA-LYTE A и HSA, в АТ-флаконе объемом 50 мл. В некоторых вариантах осуществления препарат CAR-NK-клеточной терапии представляет собой препарат аллогенной клеточной терапии, содержащий от 200×10^6 до 800×10^6 жизнеспособных NK-клеток, полученных из пуповинной крови человека, трансдуцированных ретровирусным вектором, экспрессирующим iCaspase9, CD-19 CAR и IL-15, и составленных в 36 мл среды для криоконсервации, содержащей ДМСО, трегалозу, PLASMA-LYTE A и HSA, в АТ-флаконе вместимостью 50 мл.

Способ криоконсервации NK-клеток

[132] Кроме того, в настоящем документе представлены способы криоконсервации клеток, предварительно составленных в среде для криоконсервации, описанной в настоящем документе.

[133] Клетки, которые могут быть криоконсервированы с использованием сред, описанных в настоящем документе, в общем, включают в себя любые клетки млекопитающих. В некоторых вариантах осуществления клетки, которые могут быть криоконсервированы, включают в себя стволовые клетки, другие клетки-предшественники, красные и белые кровяные клетки, сперматозоиды, ооциты, яйцеклетки и клеточные материалы, полученные из тканей и органов. Другие примеры подходящих клеток включают в себя клетки островков поджелудочной железы, хондроциты, клетки нейронального происхождения, клетки печени, клетки глаза, клетки ортопедического происхождения, клетки соединительных тканей, клетки половых органов и сердца. В некоторых других вариантах осуществления клетки включают в себя эритроциты, нейтрофильные, эозинофильные и базофильные гранулоциты, лимфоциты и тромбоциты. В некоторых вариантах осуществления лимфоцит включает в себя В-лимфоциты, Т-лимфоциты, не-В-лимфоциты, не-Т-лимфоциты, лимфоциты, полученные из индуцированных плюрипотентных клеток, и генетически модифицированные лимфоциты. Лимфоциты дополнительно включают в себя Т-клетки. Клетки-предшественники включают в себя эмбриональные стволовые клетки (ЭСК), гемопоэтические клетки-предшественники (ГКП) или индуцированные плюрипотентные клетки (иПК). В одном варианте осуществления клетки, которые подвергаются криоконсервации, являются NK-клетками и, в частности, CAR-NK-клетками.

[134] В общем, известно, что при охлаждении воды в жидком состоянии происходит фазовый переход из жидкого состояния в твердое при критической температуре. Фазовый переход является переходом первого порядка, что означает, что вода либо поглощает, либо выделяет количество энергии на объем, известное как скрытое тепло. Во время фазового перехода температура воды остается постоянной по мере добавления или отвода тепла, и в это время вода находится в смешанном состоянии, когда часть ее находится в жидком состоянии, а часть - в твердом. Температура, при которой происходит фазовый переход, может называться критической температурой фазового

перехода. При охлаждении воды ее температура снижается до достижения критической температуры. При охлаждении температура воды остается постоянной до тех пор, пока скрытое тепло не будет отведено от воды, после чего температура воды, находящейся теперь в твердом состоянии, снова снижается. Это означает, что существует период времени, в течение которого скрытое тепло отводится от воды. Время, в течение которого скрытое тепло отводится в процессе замораживания, является временем, когда могут образоваться кристаллы льда, что нежелательно при криоконсервации образцов, содержащих биологические материалы, такие как клетки.

[135] Описанные в настоящем документе среды для криоконсервации, используемые с описанными в настоящем документе способами криоконсервации, минимизируют воздействие скрытого тепла во время криоконсервации (т. е. влияние образования льда), что приводит к повышению жизнеспособности образца клеток, который был заморожен.

[136] В некоторых вариантах осуществления криоконсервированные среды и способы, описанные в настоящем документе, используют для замораживания препаратов клеточной терапии, например, свежевыделенных из организма или полученных из клеточной культуры. В различных вариантах осуществления, описанных в настоящем документе, клетки, которые подвергаются криоконсервации с использованием сред и способов, описанных в настоящем документе, представляют собой иммунные клетки, например, НК-клетки, полученные из пуповинной крови, периферической крови, Т-клеток, иПК, продуктов лейкофереза, мононуклеарных клеток или селезенки. В некоторых вариантах осуществления НК-клетки содержат химерный антигенный рецептор (CAR).

[137] В некоторых аспектах способ криоконсервации НК-клеток включает в себя взаимодействие НК-клеток со средой для криоконсервации, представленной в настоящем документе. В другом аспекте способ криоконсервации НК-клеток включает в себя этапы: а) введение естественных клеток-киллеров (НК-клеток) в среду для криоконсервации, содержащую HSA, PLASMA-LYTE A, дисахарид и CS10; 2), (b) охлаждение клеток с регулируемой скоростью до температуры $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$; и (c) хранение клеток в паровой фазе жидкого азота, что обеспечивает криоконсервацию НК-клеток.

[138] В некоторых вариантах осуществления криоконсервация проводится на клеточных суспензиях иммунных клеток млекопитающих, таких как НК-клетки. В некоторых вариантах осуществления клетки подвергаются криоконсервации в контейнере, например, в криомешке или криофлаконе. В некоторых вариантах осуществления способ криоконсервации, описанный в настоящем документе, может быть осуществлен в объеме до 30 флаконов или более. В некоторых вариантах осуществления способ криоконсервации может быть использован в объеме до 30 флаконов, 50 флаконов или 75 флаконов.

[139] В способах криоконсервации могут использоваться различные контейнеры, в том числе, например, криофлаконы или криомешки. Иллюстративные криофлаконы включают в себя, например, флаконы AT®, флаконы Nunc™ или стеклянные флаконы. В

некоторых вариантах осуществления существующие способы криоконсервации осуществляются на суспензиях иммунных клеток млекопитающих в криофлаконах, флаконах AT® или любых других подходящих контейнерах. В некоторых вариантах осуществления подходящими контейнерами являются те, которые устойчивы к ДМСО. В некоторых вариантах осуществления криофлаконы, криомешки, флаконы AT® или флаконы Nunc™, стеклянные флаконы и другие контейнеры, используемые для криоконсервации, совместимы для использования с ДМСО. В некоторых вариантах осуществления криофлаконы, криомешки, флаконы AT® или флаконы Nunc™, стеклянные флаконы и другие контейнеры, используемые для криоконсервации, не вступают в химическую реакцию с ДМСО. В некоторых вариантах осуществления контейнеры, используемые для криоконсервации, не содержат ДЭГФ и устойчивы к ДМСО (например, флаконы AT®). В различных вариантах осуществления контейнеры, используемые в настоящем документе (например, флаконы AT®), способствуют асептическому переносу клеток непосредственно в организм нуждающегося в них субъекта.

[140] Контейнеры, используемые в настоящем документе, могут иметь различные размеры, в том числе размеры, рассмотренные в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления размеры, подходящие для использования криофлаконов, как описано в настоящем документе, также подходят для использования других контейнеров, таких как флаконы AT® или флаконы Nunc™.

[141] В некоторых вариантах осуществления габариты криофлаконов составляют в пределах около 5 мм внешнего диаметра и 100 мм высоты. В некоторых вариантах осуществления габариты криофлаконов составляют около 10 мм внешнего диаметра и 75 мм высоты. В некоторых вариантах осуществления габариты криофлаконов составляют 10 мм внешнего диаметра и 50 мм высоты.

[142] В некоторых вариантах осуществления габариты криофлаконов составляют 10 мм внешнего диаметра и 48,3 мм высоты. В некоторых вариантах осуществления габариты криофлаконов составляют 10,5 мм внешнего диаметра и 48,3 мм высоты. В некоторых вариантах осуществления габариты криофлаконов составляют 11,0 мм внешнего диаметра и 48,3 мм высоты. В некоторых вариантах осуществления габариты криофлаконов составляют в пределах 11,5 мм внешнего диаметра и 48,3 мм высоты. В некоторых вариантах осуществления габариты криофлаконов составляют 12,0 мм внешнего диаметра и 48,3 мм высоты. В некоторых вариантах осуществления габариты криофлаконов составляют 12,5 мм внешнего диаметра и 48,3 мм высоты. В некоторых вариантах осуществления габариты криофлаконов составляют 13,0 мм внешнего диаметра и 48,3 мм высоты. В некоторых вариантах осуществления габариты криофлаконов составляют 13,5 мм внешнего диаметра и 48,3 мм высоты. В некоторых вариантах осуществления габариты криофлаконов составляют 14,0 мм внешнего диаметра и 48,3 мм высоты. В некоторых вариантах осуществления габариты криофлаконов составляют 14,5 мм внешнего диаметра и 48,3 мм высоты. В некоторых вариантах осуществления

габариты криофлаконов составляют 15,0 мм внешнего диаметра и 48,3 мм высоты.

[143] В некоторых вариантах осуществления высота криофлаконов составляет от около 30 мм до около 85 мм. В некоторых вариантах осуществления внешний диаметр криофлаконов составляет от около 15 мм до около 40 мм. В некоторых вариантах осуществления максимальный объем криофлакона составляет от 1 мл до 55 мл. Для использования композиций и способов, описанных в настоящем документе, подходят различные виды криофлаконов. Примеры криофлаконов, в том числе описание габаритов криофлаконов, можно найти на сайте http://www.aseptictech.com/sites/default/files/brochure_vialslines_v3.0.pdf, содержание которого включено в настоящий документ в полном объеме посредством ссылки.

[144] В некоторых вариантах осуществления высота криофлаконов составляет от около 45 мм до 100 мм. В некоторых вариантах осуществления высота криофлаконов составляет 45,3 мм. В некоторых вариантах осуществления высота криофлаконов составляет 45,6 мм. В некоторых вариантах осуществления высота криофлаконов составляет 46 мм. В некоторых вариантах осуществления высота криофлаконов составляет 46,3 мм. В некоторых вариантах осуществления высота криофлаконов составляет 46,6 мм. В некоторых вариантах осуществления высота криофлаконов составляет 47 мм. В некоторых вариантах осуществления высота криофлаконов составляет 47,3 мм. В некоторых вариантах осуществления высота криофлаконов составляет 47,6 мм. В некоторых вариантах осуществления высота криофлаконов составляет 48 мм. В некоторых вариантах осуществления высота криофлаконов составляет 48,3 мм. В некоторых вариантах осуществления высота криофлаконов составляет 48,6 мм. В некоторых вариантах осуществления высота криофлаконов составляет 49 мм. В некоторых вариантах осуществления высота криофлаконов составляет 49,3 мм. В некоторых вариантах осуществления высота криофлаконов составляет 50 мм. В некоторых вариантах осуществления высота криофлаконов составляет 50 мм. В некоторых вариантах осуществления высота криофлаконов составляет 50 мм. В некоторых вариантах осуществления высота криофлаконов составляет 55 мм. В некоторых вариантах осуществления высота криофлаконов составляет 60 мм. В некоторых вариантах осуществления высота криофлаконов составляет 55 мм. В некоторых вариантах осуществления высота криофлаконов составляет 65 мм. В некоторых вариантах осуществления высота криофлаконов составляет 55 мм. В некоторых вариантах осуществления высота криофлаконов составляет 70 мм. В некоторых вариантах осуществления высота криофлаконов составляет 75 мм. В некоторых вариантах осуществления высота криофлаконов составляет 80 мм. В некоторых вариантах осуществления высота криофлаконов составляет 85 мм. В некоторых вариантах осуществления высота криофлаконов составляет 90 мм. В некоторых вариантах осуществления высота криофлаконов составляет 95 мм. В некоторых вариантах осуществления высота криофлаконов составляет 100 мм.

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

[149] В контексте настоящего документа «объем наполнения» означает объем образца, состоящего из клеток, в контейнере. В некоторых вариантах осуществления объем наполнения меньше, чем максимальная вместимость контейнера. В некоторых вариантах осуществления объем наполнения флаконов может составлять от 15% до 90% максимальной вместимости флакона. Например, объем наполнения флаконов может составлять 15% максимальной вместимости, 20% максимальной вместимости, 25% максимальной вместимости, 30% максимальной вместимости, 35% максимальной вместимости, 40% максимальной вместимости, 45% максимальной вместимости, 50% максимальной вместимости, 55% максимальной вместимости, 60% максимальной вместимости, 65% максимальной вместимости, 70% максимальной вместимости, 75% максимальной вместимости, 80% максимальной вместимости, 85% максимальной вместимости или 90% максимальной вместимости. В некоторых вариантах осуществления криофлакон вместимостью 2 мл имеет объем наполнения 1 мл. В некоторых вариантах осуществления криофлакон вместимостью 50 мл имеет объем наполнения от 8 мл до 45 мл. В некоторых вариантах осуществления криофлакон вместимостью 50 мл имеет объем наполнения 8 мл. В некоторых вариантах осуществления криофлакон вместимостью 50 мл имеет объем наполнения 10 мл. В некоторых вариантах осуществления криофлакон вместимостью 50 мл имеет объем наполнения 12 мл. В некоторых вариантах осуществления криофлакон вместимостью 50 мл имеет объем наполнения 14 мл. В некоторых вариантах осуществления криофлакон вместимостью 50 мл имеет объем наполнения 16 мл. В некоторых вариантах осуществления криофлакон вместимостью 50 мл имеет объем наполнения 18 мл. В некоторых вариантах осуществления криофлакон вместимостью 50 мл имеет объем наполнения 20 мл. В некоторых вариантах осуществления криофлакон вместимостью 50 мл имеет объем наполнения 22 мл. В некоторых вариантах осуществления криофлакон вместимостью 50 мл имеет объем наполнения 24 мл. В некоторых вариантах осуществления криофлакон вместимостью 50 мл имеет объем наполнения 26 мл. В некоторых вариантах осуществления криофлакон вместимостью 50 мл имеет объем наполнения 28 мл. В некоторых вариантах осуществления криофлакон вместимостью 50 мл имеет объем наполнения 30 мл. В некоторых вариантах осуществления криофлакон вместимостью 50 мл имеет объем

моль/мл. В некоторых вариантах осуществления иммунные клетки могут быть криоконсервированы при концентрации 90 моль/мл. В некоторых вариантах осуществления иммунные клетки могут быть криоконсервированы при концентрации 100 моль/мл. В некоторых вариантах осуществления иммунные клетки могут быть криоконсервированы при концентрации 105 моль/мл. В некоторых вариантах осуществления иммунные клетки могут быть криоконсервированы при концентрации 110 моль/мл. В некоторых вариантах осуществления иммунные клетки могут быть криоконсервированы при концентрации 115 моль/мл. В некоторых вариантах осуществления иммунные клетки могут быть криоконсервированы при концентрации 120 моль/мл. В некоторых вариантах осуществления иммунные клетки могут быть криоконсервированы при концентрации 130 моль/мл. В некоторых вариантах осуществления иммунные клетки могут быть криоконсервированы при концентрации 140 моль/мл. В некоторых вариантах осуществления иммунные клетки могут быть криоконсервированы при концентрации 150 моль/мл. В некоторых вариантах осуществления иммунные клетки могут быть криоконсервированы при концентрации 160 моль/мл. В некоторых вариантах осуществления иммунные клетки могут быть криоконсервированы при концентрации 170 моль/мл. В некоторых вариантах осуществления иммунные клетки могут быть криоконсервированы при концентрации 180 моль/мл. В некоторых вариантах осуществления иммунные клетки могут быть криоконсервированы при концентрации 190 моль/мл. В некоторых вариантах осуществления иммунные клетки могут быть криоконсервированы при концентрации 200 моль/мл.

[151] Следует понимать, что в некоторых вариантах осуществления размороженные CAR NK-клетки присутствуют в количестве от около 100 миллионов до 1000 миллионов жизнеспособных клеток. В некоторых вариантах осуществления CAR NK-клетки представлены в количестве от 1×10^6 до 1×10^9 клеток в объеме около 36 мл в криофлаконе вместимостью 50 мл (например, в АТ-флаконе). В некоторых вариантах осуществления CAR NK-клетки представлены в количестве от 200×10^6 до 800×10^6 клеток в криофлаконе вместимостью 50 мл (например, в АТ-флаконе). В некоторых вариантах осуществления CAR NK-клетки суспендируют в среде для криоконсервации, как описано в настоящем документе, с последующей криоконсервацией, как описано в настоящем документе. После этого такие криоконсервированные NK-клетки можно хранить, как описано в настоящем документе. Образец, содержащий криоконсервированные NK-клетки, затем размораживают, как описано в настоящем документе. Размороженные клетки впоследствии вводят нуждающемуся в них пациенту. В некоторых вариантах осуществления размороженные клетки объемом около 33 мл, 34 мл, 35 мл или 36 мл вводят нуждающемуся в них пациенту с помощью адаптера для флакона, необходимого для асептического переноса с целью введения. В некоторых вариантах осуществления размороженные клетки объемом около 33 мл вводят нуждающемуся в них пациенту с помощью адаптера для флакона, необходимого для асептического переноса в шприц для

введения. В некоторых вариантах осуществления размороженные клетки объемом около 34 мл вводят нуждающемуся в них пациенту с помощью адаптера для флакона, необходимого для асептического переноса в шприц для введения. В некоторых вариантах осуществления размороженные клетки объемом около 35 мл вводят нуждающемуся в них пациенту с помощью адаптера для флакона, необходимого для асептического переноса в шприц для введения. В некоторых вариантах осуществления размороженные клетки объемом около 36 мл вводят нуждающемуся в них пациенту с помощью адаптера для флакона, необходимого для асептического переноса в шприц для введения.

[152] В некоторых аспектах способ криоконсервации НК-клеток включает в себя (а) обеспечение НК-клеток (например, CAR-НК-клеток) в среде для криоконсервации, содержащей криопротектор, альбумин, дисахарид и непирогенный и изотонический кристаллоидный раствор; (b) охлаждение клеток до температуры $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$; и (c) хранение клеток в паровой фазе жидкого азота, в результате чего происходит криоконсервация НК-клеток. В некоторых аспектах способ криоконсервации НК-клеток включает в себя (а) обеспечение контейнера, содержащего образец, включающий в себя НК-клетки, суспендированные в среде для криоконсервации, причем объем образца по меньшей мере на 5% меньше максимальной вместимости контейнера, и при этом объем образца составляет по меньшей мере 10 мл; (b) охлаждение контейнера начиная с температуры выше температуры замораживания образца до температуры около $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ или ниже в ходе многоэтапной процедуры с регулируемой скоростью для минимизации скрытой теплоты плавления; и (c) хранение клеток в паровой фазе жидкого азота, что обеспечивает криоконсервацию иммунных клеток.

[153] В некоторых вариантах осуществления способ криоконсервации образца, содержащего клетки, суспендированные в средах, описанных в настоящем документе, включает в себя изменение температуры образца от первой температуры до конечной температуры менее $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ или равной ей, что обеспечивает криоконсервацию образца при конечной температуре. В некоторых вариантах осуществления такой способ включает в себя следующие этапы: (а) помещение образца при первой температуре выше температуры замерзания образца; (b) снижение первой температуры до второй температуры при первой регулируемой скорости, причем вторая температура по меньшей мере на $2\text{ }^{\circ}\text{C}$ ниже первой температуры; (c) снижение второй температуры до третьей температуры при второй регулируемой скорости, причем третья температура по меньшей мере на $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ ниже второй температуры; (d) повышение третьей температуры до четвертой температуры при третьей регулируемой скорости, причем четвертая температура по меньшей мере на $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ выше третьей температуры; (e) снижение четвертой температуры до пятой температуры при четвертой регулируемой скорости, причем пятая температура по меньшей мере на $10\text{ }^{\circ}\text{C}$ ниже четвертой температуры; и (f) снижение пятой температуры до конечной температуры при пятой регулируемой скорости, причем конечная температура меньше или равна $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

[154] В некоторых вариантах осуществления первая температура составляет от

около 4 °С до 0 °С.

[155] В некоторых вариантах осуществления первая регулируемая скорость составляет от около 0,75 °С до 1,25 °С в минуту.

[156] В некоторых вариантах осуществления вторая температура составляет около -2 °С.

[157] В некоторых вариантах осуществления вторая регулируемая скорость составляет от около 20 °С до 30 °С в минуту.

[158] В некоторых вариантах осуществления третья температура составляет около -60 °С.

[159] В некоторых вариантах осуществления третья регулируемая скорость составляет от около 5 °С до 15 °С в минуту.

[160] В некоторых вариантах осуществления четвертая температура составляет около -25 °С.

[161] В некоторых вариантах осуществления четвертая регулируемая скорость составляет от 0,5 °С до 1,25 °С в минуту.

[162] В некоторых вариантах осуществления пятая температура составляет около -40 °С.

[163] В некоторых вариантах осуществления пятая регулируемая скорость составляет от 7 °С до 15 °С в минуту.

[164] В некоторых вариантах осуществления конечная температура меньше или равна -80 °С.

[165] В некоторых аспектах предлагается способ, включающий в себя криоконсервацию сконструированных иммунных клеток (например, CAR-NK клеток или CAR-T клеток), подходящих для клеточной терапии, с использованием сред для криоконсервации, описанных в данном документе, причем способ включает в себя поэтапное замораживание популяции сконструированных иммунных клеток с регулируемой скоростью для минимизации скрытой теплоты плавления, в котором поэтапное замораживание включает в себя охлаждение клеток со скоростью от 0,5 °С в минуту до 30 °С в минуту до конечной температуры -80 °С или ниже, тем самым обеспечивая криоконсервацию клеток.

[166] В некоторых аспектах предлагается способ размораживания криоконсервированных сконструированных иммунных клеток, причем способ включает в себя нагревание контейнера, содержащего криоконсервированные сконструированные иммунные клетки (например, NK-клетки или CAR-NK-клетки), до температуры от 37 °С до 70 °С; и перемешивание клеток со скоростью от около 100 до около 250 об./мин в течение подходящего периода времени до тех пор, пока клетки не разморозятся.

[167] В некоторых вариантах осуществления перемешивание клеток выполняют со скоростью от около 100 об./мин до около 250 об./мин. В некоторых вариантах осуществления перемешивание клеток выполняют со скоростью от около 100 об./мин до около 150 об./мин. В некоторых вариантах осуществления перемешивание клеток

выполняют со скоростью от около 100 об./мин до около 125 об./мин. В некоторых вариантах осуществления перемешивание клеток выполняют со скоростью около 100 об./мин. В некоторых вариантах осуществления перемешивание клеток выполняют со скоростью около 125 об./мин. В некоторых вариантах осуществления перемешивание клеток выполняют со скоростью около 150 об./мин. В некоторых вариантах осуществления перемешивание клеток выполняют со скоростью около 200 об./мин. В некоторых вариантах осуществления перемешивание клеток выполняют со скоростью около 250 об./мин.

[168] В некоторых вариантах осуществления общее время размораживания составляет от около 5 минут до 20 минут. Соответственно, в некоторых вариантах осуществления общее время размораживания составляет около 5 минут. В некоторых вариантах осуществления общее время размораживания составляет около 10 минут. В некоторых вариантах осуществления общее время размораживания составляет около 15 минут. В некоторых вариантах осуществления общее время размораживания составляет около 20 минут.

[169] В некоторых вариантах осуществления общее время размораживания составляет от около 5 минут до 20 минут для флакона вместимостью 50 мл. Соответственно, в некоторых вариантах осуществления общее время размораживания составляет около 5 минут для флакона вместимостью 50 мл. В некоторых вариантах осуществления общее время размораживания составляет около 10 минут для флакона вместимостью 50 мл. В некоторых вариантах осуществления общее время размораживания составляет около 15 минут для флакона вместимостью 50 мл. В некоторых вариантах осуществления общее время размораживания составляет около 20 минут для флакона вместимостью 50 мл.

[170] В некоторых вариантах осуществления размороженные клетки остаются стабильными в течение от около 1 до 6 часов. Соответственно, в некоторых вариантах осуществления размороженные клетки остаются стабильными в течение от около 2 до 4 часов. В некоторых вариантах осуществления размороженные клетки остаются стабильными в течение от около 1 до 2 часов. В некоторых вариантах осуществления размороженные клетки остаются стабильными в течение около 1 часа. В некоторых вариантах осуществления размороженные клетки остаются стабильными в течение около 2 часов. В некоторых вариантах осуществления размороженные клетки остаются стабильными в течение около 3 часов. В некоторых вариантах осуществления размороженные клетки остаются стабильными в течение около 4 часов. В некоторых вариантах осуществления размороженные клетки остаются стабильными в течение около 5 часов. В некоторых вариантах осуществления размороженные клетки остаются стабильными в течение более 5 часов.

[171] В некоторых вариантах осуществления клетки, подходящие для адоптивной клеточной терапии (например, CAR-NK-клетки, CAR-T-клетки и т.п.), подвергают криоконсервации в средах, описанных в настоящем документе, используя способ

криоконсервации, описанный в настоящем документе. Такие клетки в одном месте могут быть криоконсервированы в криофлаконе с дозой клеток, подходящей для однократного введения пациенту, после чего транспортированы при температуре около -140°C в другое место (например, в место оказания медицинской помощи), где клетки размораживают описанным в настоящем документе способом размораживания и вводят нуждающемуся в них пациенту с помощью адаптера флакона.

[172] Соответственно, в настоящем документе также предлагаются способы транспортировки клеток млекопитающих, криоконсервированных в средах, описанных в настоящем документе, при этом способ включает в себя: (а) обеспечение клеток млекопитающих в среде для криоконсервации в первом месте; (b) охлаждение клеток до -80°C в первом месте с регулируемой скоростью для минимизации скрытой теплоты плавления в соответствии с раскрытиями, приведенными в настоящем документе, тем самым обеспечивая криоконсервацию клеток млекопитающих; и (с) транспортировку криоконсервированных клеток млекопитающих во второе место (например, место оказания медицинской помощи) при температуре от около -20°C до около -140°C или ниже.

[173] В различных вариантах осуществления клетки могут быть разморожены во втором месте (например, в месте оказания медицинской помощи) перед введением нуждающемуся в этом субъекту.

[174] Первое место может совпадать с местом, в котором клетки замораживают или криоконсервируют, а второе место может совпадать с местом, в котором находится нуждающийся в них субъект. Предполагается, что первое и второе места могут находиться в одной и той же географической локации или быть географически разделены определенным расстоянием, например, несколькими милями или другим штатом, страной или континентом.

[175] В некоторых вариантах осуществления генетически модифицированные иммунные клетки, используемые для адоптивной клеточной терапии (например, CAR-NK-клетки) после размораживания обладают клеточной выживаемостью, аналогичной выживаемости свежих клеток, выделенных от того же донора. В некоторых вариантах осуществления генетически модифицированные иммунные клетки, используемые для адоптивной клеточной терапии (например, CAR-NK-клетки), после размораживания обладают клеточной выживаемостью *in vitro*, аналогичной выживаемости свежих клеток, выделенных от того же донора. В некоторых вариантах осуществления генетически модифицированные иммунные клетки, используемые для адоптивной клеточной терапии (например, CAR-NK-клетки), после их размораживания и последующей трансплантации субъекту обладают клеточной выживаемостью, аналогичной таковой у свежих клеток, выделенных от того же донора. В некоторых вариантах осуществления генетически модифицированные иммунные клетки, используемые для адоптивной клеточной терапии (например, CAR-NK-клетки), после размораживания сохраняют клеточную активность и функции, аналогичные свежeweделенным NK-клеткам, которые не были заморожены, или

были однократно заморожены и впоследствии разморожены. В некоторых вариантах осуществления генетически модифицированные иммунные клетки подходят для терапевтического применения.

[176] В некоторых вариантах осуществления среда для криоконсервации хранится при комнатной температуре до использования, а НК-клетки выдерживаются при комнатной температуре в течение тридцати минут до начала замораживания без заметной потери жизнеспособности клеток. В некоторых других вариантах осуществления среда для криоконсервации охлаждается до около 4 °C перед добавлением НК-клеток, чтобы ускорить процесс замораживания, причем необходимо, чтобы процесс замораживания начинался сразу после добавления среды для криоконсервации к клеткам для минимизации гибели клеток, индуцированной присутствием раствора.

[177] В некоторых вариантах осуществления клетки суспендируют в среде для криоконсервации для приготовления клеточной суспензии, затем приготовленную таким образом суспензию разливают в пробирки для замораживания, которые помещают непосредственно в низкотемпературную морозильную камеру при температуре -80 °C или ниже для замораживания клеток. В некоторых других вариантах осуществления пробирки для замораживания могут быть помещены в программируемую морозильную камеру для замораживания клеток с регулируемой скоростью. Сохранение замороженных клеток может осуществляться путем поддержания клеток при температуре, используемой для замораживания (например, -80 °C). Существуют различные виды компьютеризированных морозильных камер, которые снижают температуру на один градус за раз, пока она не достигнет -80 °C; в них часто применяется компьютеризированная стратегия выдерживания клеток в течение некоторого времени при температуре, при которой начинает образовываться лед, чтобы минимизировать повреждение клеток кристаллами льда.

[178] В некоторых вариантах осуществления замораживание включает в себя: (a) охлаждение клеток от начальной температуры до конечной температуры около -80 °C с использованием твердого диоксида углерода, или (b) охлаждение клеток от начальной температуры до конечной температуры от около -140 °C до около -196 °C с использованием жидкого азота.

[179] В некоторых вариантах осуществления оптимальный способ замораживания включает в себя: (a) обеспечение клеток в среде для криоконсервации, такой как описана в настоящем документе; (b) охлаждение клеток до -80 °C с регулируемой скоростью для минимизации скрытой теплоты плавления; и (c) хранение клеток в паровой фазе жидкого азота, тем самым обеспечивая криоконсервацию клеток. В некоторых вариантах осуществления регулируемая скорость для минимизации скрытой теплоты плавления включает в себя один или более этапов охлаждения клеток со скоростью от 0,75 °C в минуту до 30 °C в минуту до конечной температуры -80 °C или ниже. В некоторых вариантах осуществления общее время для достижения криоконсервации клеток составляет один час или менее.

[180] В некоторых вариантах осуществления оптимальная программа замораживания CAR-NK-клеток включает в себя следующие этапы: (a) помещение клеток при 4 °C; (b) снижение температуры со скоростью от около 0,75 °C до 1,25 °C в минуту до температуры около -2,0 °C; (c) поддержание клеток при температуре около -2,0 °C в течение около 2-4 минут; (d) снижение температуры со скоростью от около 20 °C до 30 °C в минуту до температуры около -60 °C; (e) поддержание клеток при температуре около -60 °C в течение от около 30 секунд до 2 минут; (f) повышение температуры со скоростью от около 5 °C до 15 °C в минуту до температуры около -25 °C; (g) поддержание клеток при температуре около -25 °C в течение примерно от 5 минут до 15 минут; (h) снижение температуры со скоростью от 0,75 °C до 1,25 °C в минуту до температуры около -40 °C; (i) поддержание клеток при температуре около -40 °C в течение от около 2 до 7 минут; (j) и снижение температуры со скоростью от около 7 °C до 15 °C в минуту до температуры -80 °C.

[181] В некоторых вариантах осуществления жизнеспособность размороженных клеток при использовании среды и/или способов, описанных в настоящем документе, составляет по меньшей мере около 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 99% или более. Размороженные клетки жизнеспособны в течение от около 1 до 5 часов. В некоторых вариантах осуществления размороженные клетки жизнеспособны в течение около 1 часа. В некоторых вариантах осуществления размороженные клетки жизнеспособны в течение около 2 часов. В некоторых вариантах осуществления размороженные клетки жизнеспособны в течение около 3 часов. В некоторых вариантах осуществления размороженные клетки жизнеспособны в течение около 4 часов. В некоторых вариантах осуществления размороженные клетки жизнеспособны в течение около 5 часов.

[182] В некоторых вариантах осуществления контейнер, в котором находятся клетки, стабилен при криогенных температурах и обеспечивает быстрый теплообмен для эффективного регулирования как замораживания, так и размораживания. Герметичные пластиковые флаконы (например, Nunc и Wheaton cryules) или стеклянные ампулы можно использовать для нескольких небольших объемов (от 1 до 2 мл), а большие объемы от 100 до 200 мл можно замораживать в полиолефиновых мешках, таких как мешки компании Fenwal, удерживаемые между металлическими пластинами. Другие иллюстративные контейнеры для криоконсервирования клеток включают в себя криофлаконы и/или криомешки. Иллюстративные криофлаконы включают в себя, например, АТ-флаконы.

[183] В некоторых вариантах осуществления замороженные клетки затем переносят в емкость для длительного хранения в криогенной среде. В некоторых вариантах осуществления образцы хранятся в криогенной среде в виде жидкого азота (-196 °C) или паров жидкого азота (-105 °C). Такое хранение существенно облегчается наличием высокоэффективных холодильных установок с жидким азотом. В некоторых вариантах осуществления замороженные клетки транспортируются при температуре около -140 °C или ниже. В некоторых вариантах осуществления замороженные клетки транспортируются при температуре от около -140 °C до -196 °C. В некоторых вариантах

осуществления клетки замораживают и хранят при температуре $-140\text{ }^{\circ}\text{C}$, $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ или ниже, и впоследствии транспортируют при температуре $-140\text{ }^{\circ}\text{C}$, $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$.

[184] По мере необходимости замороженные клетки и композицию подвергают процессу размораживания, после чего клетки могут быть восстановлены. В некоторых вариантах осуществления процесс размораживания происходит быстро и может быть масштабирован до 5 флаконов. В некоторых вариантах осуществления процесс размораживания происходит быстро и может быть масштабирован до 10 флаконов, 15 флаконов, 20 флаконов, 25 флаконов, 30 флаконов или более.

[185] В некоторых вариантах осуществления размораживание клеток включает в себя: (a) нагревание водяной бани до температуры от $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ до $70\text{ }^{\circ}\text{C}$; (b) перенос контейнера, содержащего криоконсервированные иммунные клетки, в предварительно нагретую водяную баню; и перемешивание содержимого контейнера со скоростью от около 100 до около 250 об./мин в течение подходящего периода времени, тем самым обеспечивая размораживание иммунных клеток.

[186] В некоторых вариантах осуществления размораживание клеток включает в себя: (a) нагревание устройства сухого размораживания до температуры от $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ до $70\text{ }^{\circ}\text{C}$; (b) перенос контейнера, содержащего криоконсервированные иммунные клетки, в предварительно нагретое устройство сухого размораживания; и перемешивание содержимого контейнера со скоростью от около 100 до около 250 об./мин в течение подходящего периода времени, тем самым обеспечивая размораживание иммунных клеток.

[187] В некоторых вариантах осуществления размораживание может быть выполнено в водяной бане или в устройстве сухого размораживания, которое способно равномерно распределять тепло по криоконсервированным образцам для размораживания образца.

[188] В некоторых вариантах осуществления размораживание выполняется путем регулирования температуры водяной бани до $40\text{ }^{\circ}\text{C}$. В некоторых вариантах осуществления размораживание выполняется путем регулирования температуры водяной бани до $45\text{ }^{\circ}\text{C}$. В некоторых вариантах осуществления размораживание выполняется путем регулирования температуры водяной бани до $50\text{ }^{\circ}\text{C}$. В некоторых вариантах осуществления размораживание выполняется путем регулирования температуры водяной бани до $55\text{ }^{\circ}\text{C}$. В некоторых вариантах осуществления размораживание выполняется путем регулирования температуры водяной бани до $60\text{ }^{\circ}\text{C}$. В некоторых вариантах осуществления размораживание выполняется путем регулирования температуры водяной бани до $65\text{ }^{\circ}\text{C}$. В некоторых вариантах осуществления размораживание выполняется путем регулирования температуры водяной бани до $70\text{ }^{\circ}\text{C}$.

[189] В некоторых вариантах осуществления размораживание выполняется с помощью сухого тепла, такого как тепло, производимое устройством сухого размораживания. Соответственно, в некоторых вариантах осуществления размораживание выполняется путем регулирования температуры устройства сухого размораживания до 40

в водяной бане с орбитальным шейкером в течение около 15 минут.

[197] В некоторых вариантах осуществления размораживание выполняется путем инкубации суспензии криоконсервированных клеток в устройстве сухого нагрева в течение около 5 минут. В некоторых вариантах осуществления размораживание выполняется путем инкубации суспензии криоконсервированных клеток в устройстве сухого нагрева в течение около 6 минут. В некоторых вариантах осуществления размораживание выполняется путем инкубации суспензии криоконсервированных клеток в устройстве сухого нагрева в течение около 7 минут. В некоторых вариантах осуществления размораживание выполняется путем инкубации суспензии криоконсервированных клеток в устройстве сухого нагрева в течение около 8 минут. В некоторых вариантах осуществления размораживание выполняется путем инкубации суспензии криоконсервированных клеток в устройстве сухого нагрева в течение около 9 минут. В некоторых вариантах осуществления размораживание выполняется путем инкубации суспензии криоконсервированных клеток в устройстве сухого нагрева в течение около 10 минут. В некоторых вариантах осуществления размораживание выполняется путем инкубации суспензии криоконсервированных клеток в устройстве сухого нагрева в течение около 11 минут. В некоторых вариантах осуществления размораживание выполняется путем инкубации суспензии криоконсервированных клеток в устройстве сухого нагрева в течение около 12 минут. В некоторых вариантах осуществления размораживание выполняется путем инкубации суспензии криоконсервированных клеток в устройстве сухого нагрева в течение около 13 минут. В некоторых вариантах осуществления размораживание выполняется путем инкубации суспензии криоконсервированных клеток в устройстве сухого нагрева в течение около 14 минут. В некоторых вариантах осуществления размораживание выполняется путем инкубации суспензии криоконсервированных клеток в устройстве сухого нагрева в течение около 15 минут.

[198] . Подобное размораживание клеток, таких как, например, CAR-NK-клетки, позволяет размороженным клеткам сохранять высокую жизнеспособность (например, более 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или более 95%) и функциональность, аналогичную клеткам, которые не были криоконсервированы после трансдукции CAR.

[199] Размороженные клетки могут быть использованы для различных целей, как описано ниже.

Использование криоконсервированных клеток

[200] Композиции, описанные в настоящем документе, в том числе композиции CAR-NK клеток, содержащиеся в среде для криоконсервации, описанной в настоящем документе, подходят для адоптивной клеточной терапии. Адоптивная клеточная терапия может применяться для лечения различных заболеваний, в том числе, например, рака. В определенных вариантах осуществления композиции CAR-NK-клеток, содержащиеся в среде для криоконсервации, описанной в настоящем документе, применимы для лечения рака или опухоли. В определенных вариантах осуществления рак включает в себя опухоли

молочной железы, сердца, легких, тонкой кишки, толстой кишки, селезенки, почек, мочевого пузыря, головы, шеи, яичников, предстательной железы, головного мозга, поджелудочной железы, кожи, костей, костного мозга, крови, тимуса, матки, яичек и печени. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой рак крови. В некоторых вариантах осуществления рак крови представляет собой В-клеточное злокачественное новообразование (например, диффузную В-крупноклеточную лимфому).

[201] В некоторых вариантах осуществления среды для криоконсервации, описанные в настоящем документе, используются для суспендирования клеток, используемых для адоптивной клеточной терапии. Соответственно, в некоторых вариантах осуществления композиции CAR-NK-клеток суспендируют в средах для криоконсервации, описанных в настоящем документе.

[202] В некоторых вариантах осуществления композиции CAR-NK-клеток, суспендированные в средах для криоконсервации, описанных в настоящем документе, используются для лечения субъекта с раком. В некоторых вариантах осуществления субъекту вводят композицию, содержащую CAR-NK-клетки в средах для криоконсервации, описанных в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления CAR-NK-клетка содержит ген анти-CD19 CAR и ген IL-15. В некоторых вариантах осуществления CAR-NK-клетка содержит ген анти-CD19 CAR, ген IL-15 и iCaspase9. В некоторых вариантах осуществления CAR-NK клетки не промывают перед введением нуждающемуся в них субъекту. В некоторых вариантах осуществления CAR-NK-клетки отмывают от сред для криоконсервации перед введением нуждающемуся в них субъекту. В некоторых вариантах осуществления размороженные клетки вводят нуждающемуся в них пациенту в течение от около 30 минут до 2 часов с момента размораживания клеток. В некоторых вариантах осуществления скорость внутривенной инфузии субъекту составляет около 2-3 минут.

[203] В некоторых вариантах осуществления адоптивная клеточная терапия применяется в комбинации с одним или более дополнительными методами лечения рака, такими как, например, противолимфоцитарная химиотерапия. Соответственно, в некоторых вариантах осуществления субъект с раком проходит противолимфоцитарную химиотерапию до введения препарата CAR-NK-клеточной терапии, составленного в средах для криоконсервации, описанных в настоящем документе.

[204] В некоторых вариантах осуществления препарат CAR-NK-клеточной терапии криоконсервируют, как описано в настоящем документе, и впоследствии размораживают перед введением нуждающемуся в нем пациенту. Например, препарат CAR-NK-клеточной терапии, как описано в настоящем документе, криоконсервируют, транспортируют, размораживают и вводят нуждающемуся в нем пациенту, как описано в настоящем документе. Соответственно, в некоторых вариантах осуществления препарат CAR-NK-клеточной терапии криоконсервируют, как описано в настоящем документе, и впоследствии размораживают перед введением нуждающемуся в нем пациенту. В некоторых вариантах осуществления препарат CAR-NK-клеточной терапии,

криоконсервированный, как описано в настоящем документе, и впоследствии размороженный перед введением нуждающемуся в нем пациенту, представляет собой препарат CAR-NK-клеточной терапии, содержащий CD19-CAR, включающий в себя анти-CD19 связывающий домен, трансмембранный домен, такой как альфа-, бета- или дзета-цепь T-клеточного рецептора, CD28, CD3-эпсилон, CD45, CD4, CD5, CD8, CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137, CD154, и внутриклеточный сигнальный домен, такой как внутриклеточный сигнальный домен FcR-гамма, FcR-бета, CD3-гамма, CD3-дельта, CD3-дзета, CD3-эпсилон, CD5, CD22, CD79a, CD79b и CD66d. Домен связывания CD-19 может представлять собой одноцепочечное антитело или фрагмент одноцепочечного антитела, такой как scFv. В одном варианте осуществления анти-CD19 связывающий домен включает в себя вариательную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 1, и/или вариательную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 2. В другом варианте осуществления CD-19 CAR может включать в себя анти-CD19 связывающий домен, трансмембранный домен CD28 (иллюстративная трансмембранная последовательность CD28 показана в SEQ ID NO: 3, сигнальный домен CD3z (иллюстративная последовательность CD3z показана в SEQ ID NO: 4 и может дополнительно включать в себя переключатель самоуничтожения, такой как iCaspase9 и/или IL-15.

[205] В одном варианте осуществления препарат CAR-NK-клеточной терапии содержит молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую вариательную область тяжелой цепи анти-CD19 связывающего домена и/или молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую вариательную область легкой цепи анти-CD19 связывающего домена.

[206] В некоторых вариантах осуществления замороженный препарат CAR-NK-клеточной терапии замораживают во флаконе (например, в АТ-флаконе вместимостью 50 мл) в средах для криоконсервации, описанных в настоящем документе, и с использованием способа, описанного в настоящем документе, и транспортируют или доставляют в том же флаконе при температуре в диапазоне от -140 °C до -196 °C в место нахождения пациента таким образом, что клетки могут быть разморожены в месте нахождения пациента и введены ему асептическим способом непосредственно с помощью шприца, соединенного с флаконом посредством адаптера для флакона (т. е. перенос из флакона в вену). Например, в некоторых вариантах осуществления способ транспортировки препарата клеточной терапии включает в себя: (а) обеспечение CAR-NK-клеток в среде для криоконсервации, как описано в настоящем документе; (б) охлаждение CAR-NK-клеток до температуры -80°C, тем самым обеспечивая криоконсервацию клеток млекопитающих; и (с) транспортировку криоконсервированных клеток млекопитающих в другое место при температуре от около -20 °C до около -140 °C или ниже. Соответственно, в некоторых вариантах осуществления криоконсервированные клетки млекопитающих транспортируют в другое место в контейнере, поддерживаемом при температуре -140 °C или ниже. В некоторых вариантах осуществления

криоконсервированные клетки млекопитающих транспортируют в другое место в контейнере, поддерживаемом при температуре от $-140\text{ }^{\circ}\text{C}$ до $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$. В некоторых вариантах осуществления криоконсервированные клетки млекопитающих транспортируют в другое место в транспортных контейнерах с криогенными условиями. В некоторых вариантах осуществления транспортированные клетки могут храниться в этих транспортных контейнерах до введения пациенту. В некоторых вариантах осуществления транспортированные клетки хранятся в другом месте при температуре $-140\text{ }^{\circ}\text{C}$ или ниже. В некоторых вариантах осуществления транспортированные клетки хранятся в другом месте при температуре от $-140\text{ }^{\circ}\text{C}$ до $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$. В некоторых вариантах осуществления транспортированные клетки хранятся в паровой фазе жидкого азота с момента получения в другом месте до момента использования в будущем. Таким образом, хранение может осуществляться с использованием морозильных камер или резервуаров клинических центров, которые поддерживают температуру на уровне $-140\text{ }^{\circ}\text{C}$ или ниже в паровой фазе жидкого азота. В некоторых вариантах осуществления препарат клеточной терапии представляет собой популяцию CD19-CAR NK-клеток, которые дополнительно содержат IL-15 и iCaspase9. В некоторых вариантах осуществления препарат клеточной терапии криоконсервируют в контейнере при концентрации от около 6 до 120 миллионов клеток на миллилитр. В некоторых вариантах осуществления препарат клеточной терапии криоконсервируют в контейнере вместимостью 50 мл при концентрации от около 6 до 120 миллионов клеток на миллилитр. В некоторых вариантах осуществления препарат клеточной терапии криоконсервируют в контейнере вместимостью 50 мл при концентрации от около 3 до 150 миллионов клеток на миллилитр. В некоторых вариантах осуществления препарат клеточной терапии криоконсервируют в контейнере вместимостью 50 мл при концентрации от около 1 до 250 миллионов клеток на миллилитр. В некоторых вариантах осуществления препарат клеточной терапии криоконсервируют в контейнере вместимостью 50 мл при концентрации от около 1 до 350 миллионов клеток на миллилитр. В некоторых вариантах осуществления препарат клеточной терапии криоконсервируют в контейнере вместимостью 50 мл при концентрации от около 1 до 500 миллионов клеток на миллилитр.

[207] В некоторых вариантах осуществления препарат клеточной терапии содержит от около 20×10^6 до 100×10^7 клеток в контейнере вместимостью 50 мл. В некоторых вариантах осуществления препарат клеточной терапии содержит от около 100×10^6 до 900×10^6 клеток в контейнере вместимостью 50 мл. В некоторых вариантах осуществления препарат клеточной терапии содержит около 50×10^6 клеток в контейнере вместимостью 50 мл. В некоторых вариантах осуществления препарат клеточной терапии содержит около 100×10^6 клеток в контейнере вместимостью 50 мл. В некоторых вариантах осуществления препарат клеточной терапии содержит около 200×10^6 клеток в контейнере вместимостью 50 мл. В некоторых вариантах осуществления препарат клеточной терапии содержит около 200×10^6 клеток в контейнере вместимостью 50 мл. В некоторых

вариантах осуществления препарат клеточной терапии содержит около 300×10^6 клеток в контейнере вместимостью 50 мл. В некоторых вариантах осуществления препарат клеточной терапии содержит около 400×10^6 клеток в контейнере вместимостью 50 мл. В некоторых вариантах осуществления препарат клеточной терапии содержит около 500×10^6 клеток в контейнере вместимостью 50 мл. В некоторых вариантах осуществления препарат клеточной терапии содержит около 600×10^6 клеток в контейнере вместимостью 50 мл. В некоторых вариантах осуществления препарат клеточной терапии содержит около 700×10^6 клеток в контейнере вместимостью 50 мл. В некоторых вариантах осуществления препарат клеточной терапии содержит около 800×10^6 клеток в контейнере вместимостью 50 мл. В некоторых вариантах осуществления препарат клеточной терапии содержит около 900×10^6 клеток в контейнере вместимостью 50 мл. В некоторых вариантах осуществления препарат клеточной терапии содержит около 1000×10^6 клеток в контейнере вместимостью 50 мл. В некоторых вариантах осуществления препарат клеточной терапии содержит около 1500×10^6 клеток в контейнере вместимостью 50 мл. В некоторых вариантах осуществления препарат клеточной терапии содержит около 2000×10^6 клеток в контейнере вместимостью 50 мл. В некоторых вариантах осуществления препарат клеточной терапии содержит около 2500×10^6 клеток в контейнере вместимостью 50 мл. В некоторых вариантах осуществления препарат клеточной терапии содержит около 3000×10^6 клеток в контейнере вместимостью 50 мл. В некоторых вариантах осуществления препарат клеточной терапии содержит около 3500×10^6 клеток в контейнере вместимостью 50 мл. В некоторых вариантах осуществления препарат клеточной терапии содержит около 4000×10^6 клеток в контейнере вместимостью 50 мл. В некоторых вариантах осуществления препарат клеточной терапии содержит около 4500×10^6 клеток в контейнере вместимостью 50 мл. В некоторых вариантах осуществления препарат клеточной терапии содержит около 5000×10^6 клеток в контейнере вместимостью 50 мл.

[208] В некоторых вариантах осуществления препарат клеточной терапии содержится в контейнере вместимостью 50 мл с объемом наполнения около 20-45 мл. В некоторых вариантах осуществления препарат клеточной терапии содержится в контейнере вместимостью 50 мл с объемом наполнения около 36 мл. В некоторых вариантах осуществления препарат клеточной терапии представляет собой иммунную клетку, такую как НК-клетка, Т-клетка или В-клетка. В некоторых вариантах осуществления иммунная клетка сконструирована таким образом, что содержит один или несколько трансгенов, например, химерный антигенный рецептор (CAR). В некоторых вариантах осуществления клетки представляют собой CAR-NK+ клетки. В некоторых

вариантах осуществления препарат клеточной терапии содержит CD19-CAR, трансген IL-15 и iCaspase9. В некоторых вариантах осуществления препарат клеточной терапии содержит от около 100×10^6 до 900×10^6 CAR-NK+ клеток в контейнере вместимостью 50 мл. В некоторых вариантах осуществления препарат клеточной терапии содержит 200×10^6 CAR-NK+ клеток в контейнере вместимостью 50 мл. В некоторых вариантах осуществления препарат клеточной терапии содержит 300×10^6 CAR-NK+ клеток в контейнере вместимостью 50 мл. В некоторых вариантах осуществления препарат клеточной терапии содержит 400×10^6 CAR-NK+ клеток в контейнере вместимостью 50 мл. В некоторых вариантах осуществления препарат клеточной терапии содержит 500×10^6 CAR-NK+ клеток в контейнере вместимостью 50 мл. В некоторых вариантах осуществления препарат клеточной терапии содержит 600×10^6 CAR-NK+ клеток в контейнере вместимостью 50 мл. В некоторых вариантах осуществления препарат клеточной терапии содержит 700×10^6 CAR-NK+ клеток в контейнере вместимостью 50 мл. В некоторых вариантах осуществления препарат клеточной терапии содержит 800×10^6 CAR-NK+ клеток в контейнере вместимостью 50 мл. В некоторых вариантах осуществления препарат клеточной терапии содержит 900×10^6 CAR-NK+ клеток в контейнере вместимостью 50 мл.

[209] Транспортированный препарат клеточной терапии может быть разморожен, как описано в настоящем документе, после чего введен нуждающемуся в нем пациенту. В некоторых вариантах осуществления препарат клеточной терапии размораживают у постели пациента. В некоторых вариантах осуществления препарат клеточной терапии не промывают перед введением нуждающемуся в нем пациенту.

[210] В некоторых вариантах осуществления транспортируемый препарат клеточной терапии остается замороженным для дальнейшего хранения в другом месте. В некоторых вариантах осуществления размороженные клетки вводят нуждающемуся в этом субъекту без разделения клеток и раствора для криоконсервации. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления размороженные клетки не промывают перед использованием. Размороженные клетки и сопутствующий раствор для криоконсервации предпочтительно нагревают до температуры тела (т. е. около 37°C) перед введением субъекту. В такой ситуации дозу клеток определяют по количеству клеток до замораживания.

[211] В некоторых вариантах осуществления размороженные клетки подвергают дальнейшему культивированию. В некоторых вариантах осуществления культивирование предполагает помещение клеток в инкубатор, удаление буферного раствора и замену буферного раствора культуральной средой, предназначенной для роста и/или дифференцировки клеток. В некоторых вариантах осуществления клетки выдерживают в инкубаторе от около 6 до 7 часов. В некоторых вариантах осуществления культуральная

среда, предназначенная для роста и/или дифференцировки клеток, включает среду Кубота и/или гормонально-определенную среду (HDM) для дифференцировки клеток.

[212] Жизнеспособность размороженных клеток может быть оценена *in vitro* с помощью различных способов, известных в данной области техники. В некоторых вариантах осуществления тест на жизнеспособность клеток *in vitro* включает анализ на вытеснение трипанового синего. В некоторых вариантах осуществления для оценки жизнеспособности клеток размороженных клеток, которые были заморожены с использованием различных сред для криоконсервации, могут быть использованы другие аналитические методы, например, маркеры жизнеспособности на основе проточной цитометрии и т. п. Средний специалист в данной области может выбрать любой аналитический метод для оценки жизнеспособности размороженных клеток, который может быть применен для оценки жизнеспособности свежих клеток.

[213] Фенотип и функции размороженных клеток могут быть оценены *in vitro* с помощью различных способов, известных в данной области техники. В некоторых вариантах осуществления тесты фенотипирования клеток *in vitro* включают в себя анализы проточной цитометрии. В некоторых вариантах осуществления анализ функции клеток *in vitro* включает в себя анализ выработки цитокинов, цитотоксичности, пролиферации и другие аналитические методы.

[214] Эффективность размороженных клеток *in vivo* может быть оценена с помощью исследований на животных, известных в данной области техники. В некоторых вариантах осуществления фенотипирование клеток *in vitro* проводят на опухолевых моделях мышей с иммунодефицитом.

[215] Криоконсервированные и размороженные клетки с использованием описанных в настоящем документе сред для криоконсервации можно использовать для любых целей, для которых может быть использована первичная клетка или свежий клеточный изолят. Криоконсервированные и размороженные клетки сохраняют высокую жизнеспособность (например, более 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или более 95%) и физиологические характеристики их нативного состояния, что позволяет применять клетки для различных целей, например, для генетических манипуляций с клетками, а также для целей клеточной терапии, например, для адоптивной клеточной терапии.

Последовательности, раскрытые в настоящем документе:

Вариабельный фрагмент легкой цепи анти-CD19, VL:

DIQMTQTTSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQQKPDGTVKLLIYHTSRLH
SGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGTKLELKR (SEQ ID
NO: 1)

Anti-CD19 Вариабельный фрагмент тяжелой цепи, VH:

EVQLQQSGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKGLEWLGVIVGS
ETTYYN SALKSRLTIKDNSK SQVFLKMNSLQTDDTAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQ
GTTVTVSSYVTVSSQDPA (SEQ ID NO: 2)

CD28:

FWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLHSDYMNMTPRRPGPTRKHY
QPYAPPRDFAAYRS (SEQ ID NO: 3)

CD3ζ:

RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRK
NPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQA
LPPRGP (SEQ ID NO: 4)

ПРИМЕРЫ

[216] Другие отличительные признаки, задачи и преимущества настоящего изобретения становятся очевидными из последующих примеров. Однако следует понимать, что примеры с указанием вариантов осуществления настоящего изобретения приведены только в качестве иллюстрации, а не ограничения. Различные изменения и модификации в пределах объема настоящего изобретения станут очевидными специалистам в данной области техники из примеров.

[217] Использовались CAR-NK-клетки, содержащие CD19 CAR, IL-15 и iCaspase9. Предполагается, что составы, описанные и приведенные ниже, будут применяться с другими препаратами адоптивной клеточной терапии, в том числе с другими CAR-NK-клетками. Иллюстративные CAR-NK-клетки, использованные в этих примерах, представляли собой генетически сконструированные NK-клетки из пуповинной крови, включавшие в себя CD19-CAR, содержащий анти-CD19 связывающий домен, содержащий переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 1, и/или переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 2.

Пример 1. Приготовление сред для криоконсервации

[218] В этом примере показаны различные среды для криоконсервации, приготовленные для криоконсервации естественных клеток-киллеров с химерным антигенным рецептором (CAR-NK-клетки).

[219] В этом примере было приготовлено пять (5) различных сред для криоконсервации. Среды для криоконсервации представляли собой среду для криоконсервации № 1, среду для криоконсервации № 2, среду для криоконсервации № 3, среду для криоконсервации № 4 и среду для криоконсервации № 5. Состав всех этих сред для криоконсервации представлен в **таблице 1**. Эффективность указанных сред для криоконсервации проверяли путем криоконсервации CAR-NK-клеток, после чего оценивали их эффективность *in vivo* на мышах линии NOD.Cg-Prkdcscid Il2rgtm1Wjl/SzJ («мыши NSG»).

[220] В качестве контроля использовались свежие CAR-NK-клетки. В случае CAR-NK-клеток использовались замороженные NK-клетки, полученные из единицы пуповинной крови, в которых был трансдуцирован ген, кодирующий нацеленный на опухоль CD19 CAR (iC9/CAR.19/IL15, *Leukemia* 32 (2018)520-531, включена в настоящий документ в полном объеме посредством ссылки). Примерный CD19 CAR, используемый в настоящем документе, описан в *Leukemia* 32 (2018)520-531, включена в настоящий

документ в полном объеме посредством ссылки. Криоконсервированные клетки размораживали и вводили мышам NSG с опухолевыми клетками Raji в приведенном ниже примере 2.

Таблица 1. Состав сред для криоконсервации.

Среды для криоконсервации	Состав
1	50% PLASMA-LYTE-HEPES+35% декстран/декстроза+10% HSA+5% ДМСО
2	40% PLASMA-LYTE A+50% CS10 +10% HSA
3	50% MEM-HEPES+35% декстран/декстроза+10% HSA+5% ДМСО
4	40% MEM+50% CS10 +10% HSA
5	38,6% PLASMA-LYTE A+50% CS10 +10% HSA+0,8% AA+Витамин (1 флакон 0,2% и 2 флакона 0,4%) + 30 ммоль трегалозы

Пример 2. Сравнение эффективности *in vivo* полученных из пуповинной крови CAR NK-клеток, которые были сохранены с использованием различных сред для криоконсервации

[221] В данном примере сравнивается эффективность *in vivo* CAR-NK-клеток, которые были криоконсервированы с использованием 5 различных сред для криоконсервации, представленных в таблице 1, без промывания для непосредственной инъекции с ФСБ буферным раствором и свежих CAR-NK-клеток в качестве групп отрицательного и положительного контроля, соответственно. На **Фиг. 2 панелях А-С** показаны различные группы лечения, в том числе получавшие клетки в дозе 10 моль с 5 средами для криоконсервации. Данные свидетельствуют о том, что испытанные составы продемонстрировали эффективность, аналогичную свежим NK-клеткам.

[222] Эффективность CAR-NK-клеток *in vivo* проверяли на самках мышей NOD SCID Gamma (NSG), которым одновременно вводили клетки Raji лимфомы Беркитта человека, экспрессирующие люциферазу (Raji B.luc). За один день до лечения (Д-1) самки мышей линии NSG были рандомизированы на группы по массе тела, каждая из которых состояла из 5 мышей, после чего они получали облучение всего тела в 1,5 Грея (Гр). Мыши линии NSG, самки, в возрасте 12 недель, были получены из The Jackson Laboratory. В день 0 мышам дополнительно вводили 2×10^4 биолюминесцентных опухолевых клеток Raji B luc и проводили лечение путем внутривенной инъекции через хвостовую вену. Мышам вводили люциферин *in vivo*, а через девять минут после введения субстрата получали вентральные изображения всего тела. В течение 36 дней после лечения еженедельно измеряли активность люциферазы у живых мышей с помощью системы визуализации IVIS[®] Spectrum CT (PerkinElmer) по общему потоку излучения. В день визуализации мышам вводили субстрат люциферина (всего 150 мг/кг; в/б) и помещали в

камеру индукции анестезии (2,5-3,5% изофлюрана в кислороде). После седации мышей помещали в камеру для получения изображений через девять минут после введения субстрата люциферина. Такая же процедура, описанная в данном разделе, применима и к другим примерам, где обсуждается эффективность клеток *in vivo*.

[223] Были проведены дополнительные исследования сред для криоконсервации *in vivo*. На **ФИГ. 3 панели А** представлена краткая информация о различных средах для криоконсервации, протестированных в этих исследованиях. Эти эксперименты показали, что среды для криоконсервации (№ 9, 50% PLASMA-LYTE A, содержащая 20% HSA и 30 ммоль трегалозы+50% CS10) обеспечивали наиболее выраженное уменьшение опухоли и лучшую выживаемость, сравнимую со свежими клетками, что указывает на эффективность *in vivo* при уменьшении количества клеток Raji у испытуемого животного (**ФИГ. 3 панели В-Е**).

[224] Любой состав, содержащий подходящие компоненты для сред для криоконсервации, описанных в настоящем документе, подходит для описанных способов. Например, среды для криоконсервации, содержащие одно или более из хлорида натрия, глюконата натрия, тригидрата ацетата натрия, хлорида калия, хлорида магния, аденозина, декстрана, лактобионовой кислоты, HEPES, гидроксида натрия, L-глутатиона (восстановленная форма), хлорида калия, бикарбоната калия; фосфата калия, декстрозы; сахарозы, маннита, хлорида кальция и хлорида магния; гидроксида натрия, гидроксида калия, ДМСО. В качестве дополнительного примера, подходящие среды для криоконсервации могут содержать сывороточный альбумин человека (HSA), Na⁺, K⁺, Mg²⁺, HEPES, один или более дисахаридов, сахарный спирт, декстран, метаболит и антиоксидант.

[225] На **фигуре 3 панели Е** показана эффективность CAR-NK-клеток *in vivo* в Д20, Д27 и Д34 после введения CAR-NK-клеток. На Д20 после лечения у мышей, получавших только ФСБ буферный раствор и не получавших CAR-NK-клетки, наблюдалась очень высокая экспрессия люциферазы. У мышей, получивших свежие CAR-NK-клетки, наблюдался лишь незначительный уровень экспрессии люциферазы. Мыши, которых лечили разными составами, показали различный уровень экспрессии люциферазы, что свидетельствует об эффективности *in vivo* CAR-NK-клеток, которые были криоконсервированы с использованием различных сред для криоконсервации.

[226] На **ФИГ. 3Е** дополнительно показана эффективность CAR-NK-клеток *in vivo* через 27 дней после введения CAR-NK клеток. У мышей, получавших только ФСБ буферный раствор и не получавших CAR-NK-клетки, уровень экспрессии люциферазы был еще более высоким по сравнению с Д20, и 3 из 5 мышей погибли. Мыши, получившие CAR-NK-клетки в разных средах для криоконсервации, показанных на **ФИГ. 3Е**, демонстрировали различный уровень экспрессии люциферазы, а некоторые мыши начали умирать. Выраженность экспрессии люциферазы и уровень смертности мышей зависели от среды для криоконсервации. В случае среды для криоконсервации № 9 экспрессия люциферазы была существенно выше, чем в других ионных группах сред для

криоконсервации, но аналогична таковой в группе, получавшей свежие клетки, при этом не наблюдалось гибели мышей. По состоянию на 34-й день мыши в группе введения ФСБ и других группах введения криоконсервированных CAR-NK-клеток погибли. Однако 2 из 5 мышей, получавших среду для криоконсервации № 9, выжили с незначительным уровнем экспрессии люциферазы, близким к таковому в группе, получавшей свежие клетки. Таким образом, у мышей, получавших различные составы, наблюдались различные уровни экспрессии люциферазы и выживаемости, что свидетельствует об эффективности *in vivo* CAR-NK-клеток, криоконсервированных с использованием различных сред для криоконсервации. Кроме того, NK-клетки, криоконсервированные с помощью среды для криоконсервации № 9, продемонстрировали такую же эффективность *in vivo*, как и свежие клетки, значимо превосходя другие среды для криоконсервации. В таблице 2 представлены иллюстративные компоненты состава, которые были разработаны и испытаны для получения составов для криоконсервации, описанных в настоящем документе.

Таблица 2. Иллюстративные испытанные компоненты состава.

Компоненты	Поставщик
PLASMA-LYTE A	Baxter
MEM	Thermo Fisher
25% HAS	Shire
Глутатион	Sigma Aldrich
Раствор аминокислот	Baxter
DMCO	Origen Biomedical
Раствор витамина	Baxter
CryoStor® CS10	BioLife Solutions
Трегалоза	J. T. Baker

[227] В некоторых вариантах осуществления отдельные компоненты среды для криоконсервации включают в себя, например, один или более из хлорида натрия, глюконата натрия, тригидрата ацетата натрия, хлорида калия, хлорида магния, аденозина, декстрана, лактобионовой кислоты, HEPES, гидроксида натрия, L-глутатиона (восстановленная форма), хлорида калия, бикарбоната калия, фосфата калия, декстрозы, сахарозы, маннита, хлорида кальция и хлорида магния; гидроксида натрия, гидроксида калия, ДМСО, сывороточного альбумина человека (HSA), Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , HEPES, одного или более дисахаридов, сахарного спирта, декстрана, метаболита и антиоксиданта.

Пример 3. Эффективность *in vivo* восстановленных свежих CAR-NK-клеток в сравнении с криоконсервированными клетками еще у 3 различных доноров

[228] В данном примере сравнивается эффективность *in vivo* свежих клеток и криоконсервированных CAR-NK-клеток. В этом примере NK-клетки, криоконсервированные в составе для криоконсервации № 9, были получены от 3

различных доноров. Кроме того, NK-клетки, криоконсервированные в составе для криоконсервации № 9, были заполнены в различные контейнеры разного объема с применением различной процедуры замораживания и размораживания в соответствии с представленной информацией. Результаты этих исследований показаны на **ФИГ. 4А-4І**.

[229] В случае CAR-NK-клеток также использовались замороженные NK-клетки, полученные из единицы пуповинной крови, в которых был трансдуцирован ген, кодирующий нацеленный на опухоль CD19 CAR (iC9/CAR.19/IL15, Leukemia 32 (2018)520-531, включена в настоящий документ в полном объеме посредством ссылки). После извлечения CAR-NK-клеток и перед приготовлением состава полученные клетки промывали холодным (от 2 °C до 8 °C) PLASMA-LYTE A, содержащим 5-20% HSA, а затем центрифугировали для осаждения клеток. Из осажденных клеток получали состав с объемным соотношением 1:2:1 (PLASMA-LYTE A, содержащий 20% HSA: CS10: трегалоза в PLASMA-LYTE A, содержащем 20% HSA), после чего состав разливали в различные контейнеры, по 1 мл в криофлаконы вместимостью 2 мл, по 1 мл в закрытые флаконы вместимостью 2 мл и по ~36 мл в закрытые флаконы вместимостью 50 мл. CAR-NK-клетки замораживали с использованием оптимальной программы замораживания, после чего хранили в паровой фазе жидкого азота. Оптимальная программа замораживания CAR-NK-клеток включает в себя следующие этапы: (а) помещение клеток при 4 °C; (b) снижение температуры со скоростью от около 0,75 °C до 1,25 °C в минуту до температуры около -2,0 °C; (c) поддержание клеток при температуре около -2,0 °C в течение около 2-4 минут; (d) снижение температуры со скоростью от около 20 °C до 30 °C в минуту до температуры около -60 °C; (e) поддержание клеток при температуре около -60 °C в течение от около 30 секунд до 2 минут; (f) повышение температуры со скоростью от около 5 °C до 15 °C в минуту до температуры около -25 °C; (g) поддержание клеток при температуре около -25 °C в течение примерно от 5 минут до 15 минут; (h) снижение температуры со скоростью от 0,75 °C до 1,25 °C в минуту до температуры около -40 °C; (i) поддержание клеток при температуре около -40 °C в течение от около 2 до 7 минут; (j) и снижение температуры со скоростью от около 7 °C до 15 °C в минуту до температуры -80 °C.

[230] На **ФИГ. 4А - ФИГ. 4D** показана эффективность CAR-NK-клеток *in vivo* через 36 дней после введения свежих или криоконсервированных NK-клеток в криофлаконах вместимостью 2 мл, АТ-флаконах вместимостью 2 мл и АТ-флаконах вместимостью 50 мл. Мыши, получавшие только ФСБ буферный раствор (контроль), начали умирать еще до 21-го дня, как показано знаком в виде крестика (x) на **ФИГ. 4Е и ФИГ. 4F**. Мыши, получившие свежие и криоконсервированные CAR-NK-клетки, показали сопоставимую экспрессию люциферазы, демонстрируя *in vivo* эффективность CAR-NK-клеток, криоконсервированных в составе для криоконсервации 9, замороженных в трех разных контейнерах и размороженных по индивидуальной оптимизированной программе, у всех трех доноров.

[231] На **ФИГ. 4G и ФИГ. 4І** показана эффективность *in vivo* CAR-NK-клеток из

свежих или криоконсервированных CAR-NK-клеток. Эффективность CAR-NK-клеток *in vivo* выражалась в показателях общего потока, количественного выражения уровня экспрессии люциферазы. Криоконсервированные CAR-NK-клетки от всех 3 доноров показали *in vivo* эффективность CAR-NK-клеток на 20-й день.

Пример 4. Эффективность *in vitro* и фенотипирование восстановленных свежих CAR-NK-клеток в сравнении с криоконсервированными клетками у разных доноров

[232] На **ФИГ. 5** показаны эффективность *in vitro* и фенотипирование CAR-NK-клеток из свежих или криоконсервированных CAR-NK-клеток. Эффективность CAR-NK-клеток *in vitro* выражалась в количестве погибших при различном соотношении Е/Т, что является количественным выражением эффективности гибели клеток (Фиг. 5А, 5В, 5D и 5Е). Криоконсервированные CAR-NK-клетки одного донора при различных концентрациях жизнеспособных клеток 10 моль/мл, 80 моль/мл и 120 моль/мл показали сопоставимую эффективность гибели CAR-NK-клеток *in vitro* после размораживания (Фиг. 5А и 5В) и сопоставимое иммунофенотипирование (Фиг. 5С). Криоконсервированные CAR-NK-клетки при различном объеме наполнения 1 мл, 8 мл, 18 мл, 30 мл и 45 мл у одного донора показали сопоставимую эффективность гибели CAR-NK-клеток *in vitro* после размораживания (Фиг. 5D и 5Е) и сопоставимое иммунофенотипирование (Фиг. 5F).

[233] На **Фиг. 6** показана эффективность *in vitro* (цитотоксичность), жизнеспособность, фенотипирование (%NK, %CD3+ и %CAR+) свежих CAR-NK-клеток, сопоставимые с криоконсервированными CAR-NK-клетками от 4 различных доноров.

Пример 5. Лечение нуждающегося субъекта с помощью CAR-NK-клеток, замороженных, транспортированных, размороженных, введенных с помощью флакона

[234] В данном примере описывается замораживание, размораживание и примерное использование сконструированных CAR NK-клеток, как описано в настоящем документе. Примерное использование, описанное в данном примере, заключается в замораживании, размораживании и введении CAR NK-клеток пациенту с раком, например, пациенту с диффузной В-крупноклеточной лимфомой.

[235] CAR-NK клетки, содержащие CD19, IL-15 и iCaspase9, суспендируют в среде для криоконсервации, содержащей сывороточный альбумин человека (HSA), PLASMA-LYTE A, трегалозу и CS10. CAR-NK-клетки замораживают в концентрации от 6 моль/мл до 25 моль/мл в криофлаконах вместимостью 50 мл при номинальном объеме образца около 36 мл. Один такой криофлакон может содержать от 2 до 4 доз для нуждающегося пациента. CAR-NK-клетки замораживают с помощью следующей программы замораживания, включающей в себя: (а) помещение образца при первой температуре выше температуры замерзания образца; (b) снижение первой температуры до второй температуры при первой регулируемой скорости, где вторая температура по меньшей мере на 2 °C ниже первой температуры; (c) снижение второй температуры до третьей

температуры при второй регулируемой скорости, где третья температура по меньшей мере на 40 °С ниже второй температуры; (d) повышение третьей температуры до четвертой температуры при третьей регулируемой скорости, где четвертая температура по меньшей мере на 20 °С выше третьей температуры; (e) снижение четвертой температуры до пятой температуры при четвертой регулируемой скорости, где пятая температура по меньшей мере на 10 °С ниже четвертой температуры; и (f) снижение пятой температуры до конечной температуры при пятой регулируемой скорости, где конечная температура меньше или равна -80 °С. Как правило, весь процесс замораживания длится менее 1 часа.

[236] После того как клетки заморожены, образец хранится при температуре -140 °С или ниже. Такие температуры могут быть достигнуты различными способами, например, помещением образца в паровую фазу жидкого азота. Замороженный продукт может оставаться на складе при температуре -140 °С или ниже до тех пор, пока не понадобится для использования. Время хранения клеток может составлять 1 неделю, 2 недели, 1 месяц, 6 месяцев, 1 год, 2 года, 5 лет, 10 лет и более.

[237] Когда клетки потребуются для использования, например, для проведения аллогенной клеточной терапии, клетки транспортируют из пункта хранения в больницу или другое место, где пациент ожидает пересадки клеток. В процессе транспортировки клетки поддерживаются при температуре -140 °С или ниже до тех пор, пока они не попадут в больницу или другое место. По прибытии на место клетки размораживают. Клетки можно разморозить следующим образом: нагреть контейнер, содержащий криоконсервированные сконструированные иммунные клетки, до температуры от 37 °С до 70 °С; и перемешивать клетки со скоростью от около 100 до около 250 об./мин в течение подходящего периода времени, пока клетки не разморозятся. Нагревание можно проводить, например, при температуре от 60 °С до 65 °С одновременно с перемешиванием образца клеток со скоростью от 100 до 125 об./мин. Нагревание может выполняться либо с помощью водяной бани, либо с помощью устройства сухого нагревания. Как правило, общее время размораживания клеток составляет около 10 минут.

[238] Размораживание криофлакона вместимостью 50 мл может быть выполнено у постели пациента или в другом ближайшем удобном месте для пациента, которому будут вводиться клетки. После размораживания образца общий объем образца составит от около 34 до 36 мл. До 34 мл размороженного образца вводят пациенту с помощью адаптера для флакона для асептического введения. Один размороженный образец может содержать несколько доз.

ЭКВИВАЛЕНТЫ И ОБЪЕМ

[239] Специалистам в данной области техники будут понятны, или они смогут установить, используя не более чем рутинные эксперименты, многочисленные эквиваленты конкретных вариантов осуществления изобретения, описанных в настоящем документе. Объем настоящего изобретения не ограничивается приведенным выше описанием, а скорее соответствует изложенному в приведенной ниже формуле изобретения:

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Среда для криоконсервации, содержащая криопротектор, альбумин, дисахарид, а также непирогенный и изотонический кристаллоидный раствор.
2. Среда для криоконсервации по п. 1, в которой криопротектор выбран из группы, состоящей из диметилсульфоксида (ДМСО), глицерина, этиленгликоля и пропандиола.
3. Среда для криоконсервации по п. 1, в которой альбумин представляет собой сывороточный альбумин человека (HSA).
4. Среда для криоконсервации по п. 1, в которой непирогенный и изотонический кристаллоидный раствор содержит хлорид натрия, глюконат натрия, хлорид калия, тригидрат ацетата натрия, хлорид калия, хлорид магния.
5. Среда для криоконсервации по п. 1, в которой непирогенный и изотонический кристаллоидный раствор выбран из группы, состоящей из PLASMA-LYTE A, 0,9% нормального физиологического раствора, лактатного раствора Рингера и раствора декстрозы в воде.
6. Среда для криоконсервации по любому из предыдущих пунктов, в которой непирогенный и изотонический кристаллоидный раствор присутствует в концентрации от 25% об./об. до 50% об./об.
7. Среда для криоконсервации по любому из предыдущих пунктов, в которой дисахарид выбран из группы, состоящей из сахарозы, лактозы, мальтозы, трегалозы, целлобиозы и хитобиозы.
8. Среда для криоконсервации по п. 7, в которой дисахарид представляет собой трегалозу.
9. Среда для криоконсервации, содержащая хлорид натрия, хлорид калия, гексагидрат хлорида магния, тригидрат ацетата натрия, глюконат натрия, аденозин, декстран-40, лактобионовую кислоту, HEPES, гидроксид натрия, L-глутатион, хлорид калия, бикарбонат калия; фосфат калия, декстрозу, сахарозу, маннит, дигидрат хлорида кальция, хлорид магния, гидроксид натрия, гидроксид калия, ДМСО, сывороточный альбумин человека и трегалозу.
10. Среда для криоконсервации по п. 9, содержащая около 2,5% об./об. сывороточного альбумина человека (HSA).
11. Среда для криоконсервации по п. 9, содержащая от около 10 ммоль до 100 ммоль трегалозы.
12. Среда для криоконсервации по п. 11, содержащая около 30 ммоль трегалозы.
13. Среда для криоконсервации, содержащая: сывороточный альбумин человека (HSA), хлорид натрия, глюконат натрия, тригидрат ацетата натрия, хлорид калия, хлорид магния, диметилсульфоксид (ДМСО) и трегалозу.
14. Среда для криоконсервации по п. 13, в которой HSA присутствует в концентрации от около 1,25% об./об. до 15% об./об., а трегалоза присутствует в концентрации от около 10 ммоль до 100 ммоль.
15. Среда для криоконсервации по п. 14, в которой HSA присутствует в

концентрации около 10% об./об.

16. Среда для криоконсервации по п. 15, в которой концентрация трегалозы составляет около 30 ммоль.

17. Среда для криоконсервации, подходящая для иммунных клеток, содержащая: PLASMA-LYTE A, сывороточный альбумин человека (HSA), трегалозу и криопротектор.

18. Среда для криоконсервации по п. 17, в которой криопротектор представляет собой ДМСО.

19. Среда для криоконсервации по п. 17 или п. 18, дополнительно содержащая 0-55 ммоль HEPES и 0-6% об./об. декстрана.

20. Среда для криоконсервации по п. 17, п. 18 или п. 19, дополнительно содержащая сахарный спирт, декстран, метаболит и антиоксидант.

21. Среда для криоконсервации по п. 20, в которой сахарный спирт представляет собой маннит в концентрации 0-100 ммоль.

22. Среда для криоконсервации по п. 20, в которой метаболит представляет собой аденозин.

23. Среда для криоконсервации по п. 20, в которой антиоксидант представляет собой глутатион.

24. Среда для криоконсервации по любому из предыдущих пунктов, которая подходит для криоконсервации естественных клеток-киллеров (NK-клеток).

25. Среда для криоконсервации по п. 24, причем NK-клетки представляют собой NK-клетки, полученные из пуповинной крови или индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (иПСК).

26. Среда для криоконсервации по п. 24, причем NK-клетки представляют собой генетически сконструированные NK-клетки из пуповинной крови.

27. Среда для криоконсервации по п. 26, причем NK-клетки являются генетически сконструированными с химерным антигенным рецептором (CAR).

28. Среда для криоконсервации по п. 27, причем CAR связывает CD19.

29. Среда для криоконсервации по п. 26, причем генетически сконструированные NK-клетки из пуповинной крови включают в себя NK-клетки, полученные из пуповинной крови человека (CB-NK), трансдуцированные ретровирусным вектором, экспрессирующим iCaspase9, CD19-CAR и IL-15.

30. Среда для криоконсервации по п. 29, причем генетически сконструированные NK-клетки из пуповинной крови присутствуют в концентрации от 6 моль/мл до 120 моль/мл.

31. Способ криоконсервации естественных клеток-киллеров (NK-клетки), который включает в себя:

(a) приведение NK-клеток в контакт со средой для криоконсервации, содержащей криопротектор, альбумин, дисахарид, а также непирогенный и изотонический кристаллоидный раствор;

(b) охлаждение клеток до температуры -80°C ; и

(с) хранение клеток в паровой фазе жидкого азота, тем самым обеспечивая криоконсервацию НК-клеток.

32. Способ по п. 31, в котором НК-клетки являются свежевыделенными или полученными из клеточной линии.

33. Способ по любому из пп. 31-32, в котором НК-клетки получены из пуповинной крови, периферической крови, Т-клеток или иПСК.

34. Способ по п. 33, в котором НК-клетки включают НК-клетки, полученные из пуповинной крови человека (СВ-НК), трансдуцированные ретровирусным вектором, экспрессирующим iCaspase9, CD19-CAR и IL-15.

35. Способ по п. 33, дополнительно включающий в себя этап размораживания НК-клеток.

36. Способ по п. 35, в котором размороженные НК-клетки сохраняют клеточную активность и функции, аналогичные свежевыделенным НК-клеткам, которые не подвергались замораживанию.

37. Способ по п. 35, в котором размороженные НК-клетки подходят для терапевтического применения.

38. Способ по п. 35, в котором размораживание НК-клеток включает в себя:

(а) нагревание водяной бани до температуры от 37 °С до 70 °С;

(b) перенос контейнера, содержащего криоконсервированные НК-клетки, в предварительно нагретую водяную баню; и

(b) перемешивание содержимого контейнера со скоростью от около 100 до около 250 об./мин в течение подходящего периода времени, тем самым обеспечивая размораживание НК-клеток.

39. Препарат клеточной терапии для введения нуждающемуся в нем субъекту, содержащий:

(а) популяцию сконструированных НК-клеток, включающую клетки из пуповинной крови, трансдуцированные ретровирусным вектором, экспрессирующим анти-CD19 химерный антигенный рецептор (CAR), IL-15 и iCaspase9; и

(b) среду для криоконсервации по любому из пп. 1-30.

40. Популяция химерных антигенных рецепторов CD19 (CAR) НК-клеток в среде для криоконсервации по любому из пп. 1-29.

41. Популяция по п. 40, в которой CD19-CAR НК-клетки содержат IL-15.

42. Популяция по п. 40 или п. 41, в которой CD19-CAR НК-клетки содержат iCaspase9.

43. Препарат клеточной терапии, содержащий популяцию CAR-НК-клеток, включающую НК-клетки из пуповинной крови, генетически модифицированные для экспрессии CD-19 CAR, iCaspase и IL-15, составленные в среде для криоконсервации, содержащей PLASMA-LYTE A, трегалозу, CS10 и HSA.

44. Препарат клеточной терапии по п. 43, в котором концентрация клеток составляет от 6 миллионов клеток/мл до 200 миллионов клеток/мл.

45. Препарат клеточной терапии по п. 43 или п.42, в котором общее количество жизнеспособных клеток после размораживания составляет от около 200 миллионов до около 800 миллионов клеток.

По доверенности

Составы для криоконсервации и результаты экспериментов *in vivo* с криоконсервированными CAR-NK-клетками

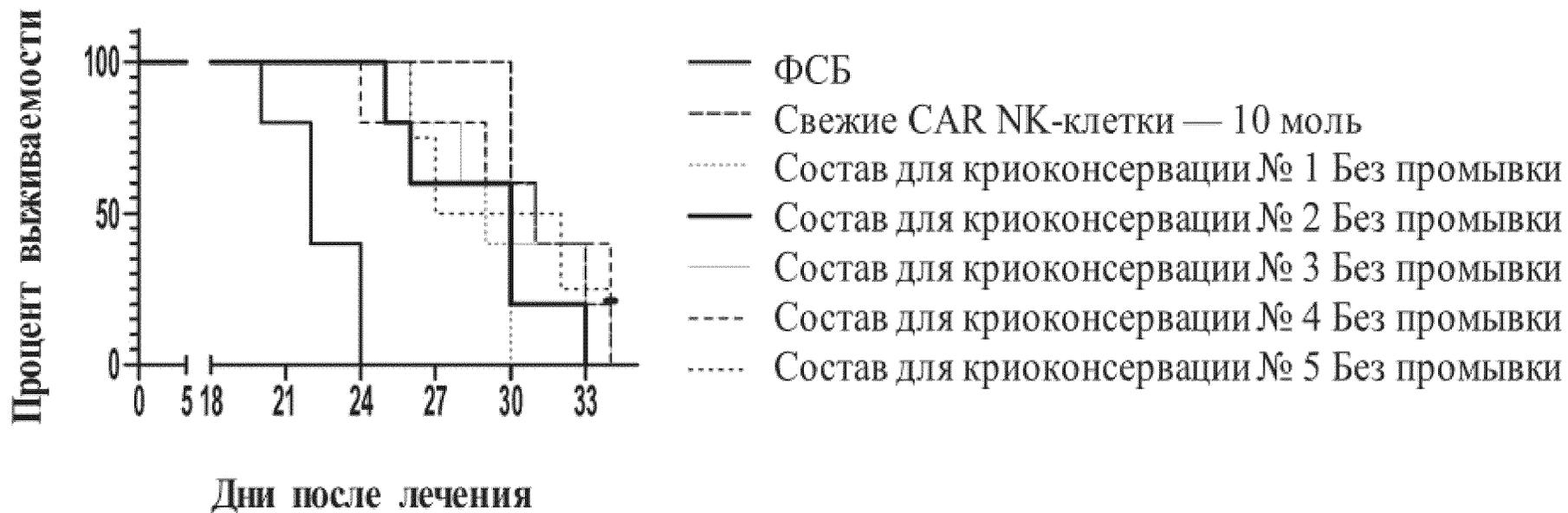
Состав	Подготовка образца	Доза	Кол-во мышей	Трансдукция/ День сбора	Композиция состава
ФСБ		Н/П	5	Н/П	ФСБ буфер
Свежие CAR NK-клетки	Свежие CAR NK	1×10^7	5	Д6/Д25	Свежие CAR NK-клетки в ФСБ буфере
Состав для криоконсервации № 1	Прямое введение	1×10^7	5	Д6/25	50 % PLASMA-LYTE A-HEPES + 35 % декстран/декстроза + 10 % HSA + 5 % ДМСО
Состав для криоконсервации № 2	Прямое введение	1×10^7	5	Д6/25	40 % Plasma-LYTEA + 50 % CS10 + 10 % HSA
Состав для криоконсервации № 3	Прямое введение	1×10^7	5	Д6/25	50 % MEM-HEPES + 35 % декстран/декстроза + 10 % HSA + 5 % ДМСО
Состав для криоконсервации № 4	Прямое введение	1×10^7	5	Д6/25	40 % MEM + 50 % CS10 + 10 % HSA
Состав для криоконсервации № 5	Прямое введение	1×10^7	5	Д6/25	38,6 % Plasma-LYTE A + 50 % CS10 + 10 % HSA + 0,8 % AA + Витамин (1 флакон 0,2 % и 2 флакона 0,4 %) + 30 ммоль трегалозы

1/22

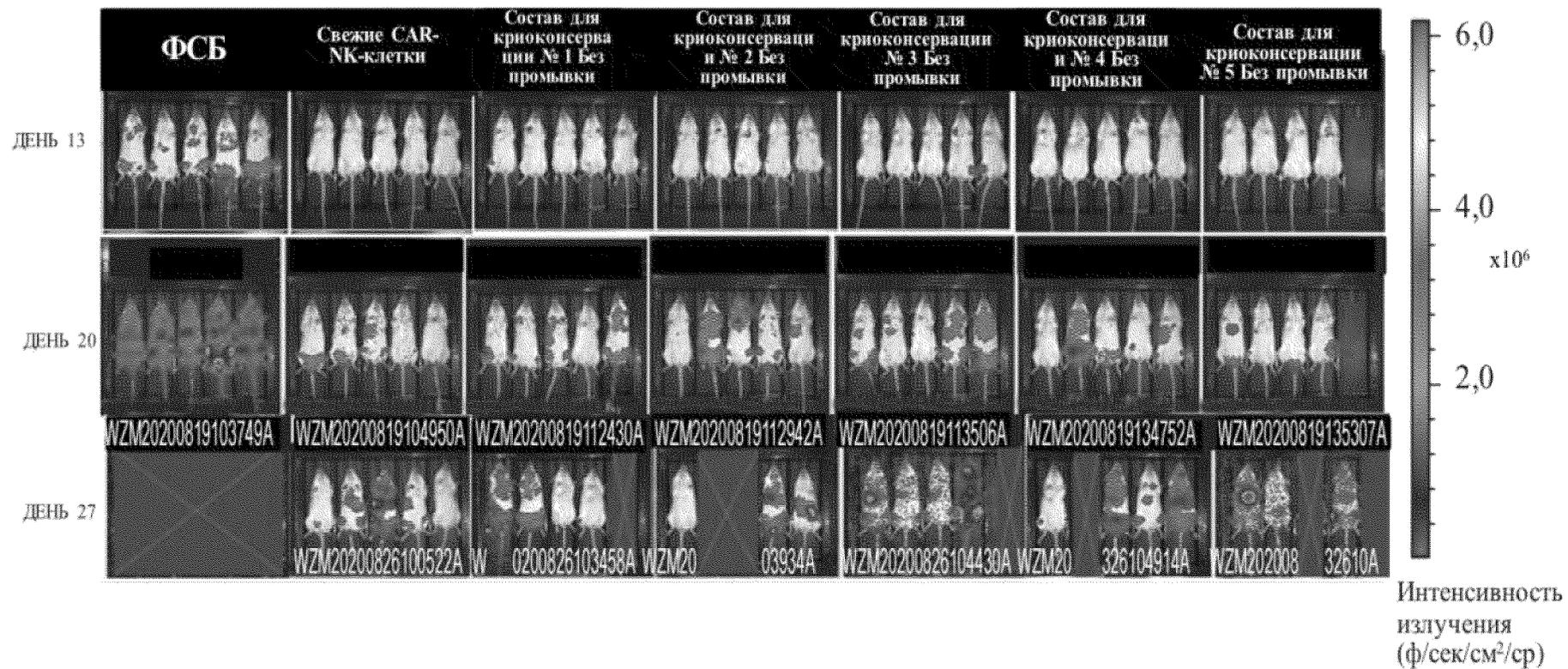
Фиг. 1

578926

Выживаемость — без промывки



Фиг. 2А



ДЕНЬ 13
ДЕНЬ 20
ДЕНЬ 27

WZM20200819103749A | WZM20200819104950A | WZM20200819112430A | WZM20200819112942A | WZM20200819113506A | WZM20200819134752A | WZM20200819135307A
WZM20200826100522A | WZM20200826103458A | WZM20200826104430A | WZM20200826104914A | WZM20200826104914A | WZM20200826104914A | WZM20200826104914A

Интенсивность излучения (ф/сек/см²/ср)

Цветовая шкала
Мин. = 9,00e3
Макс. = 6,19e6

ФИГ. 2В

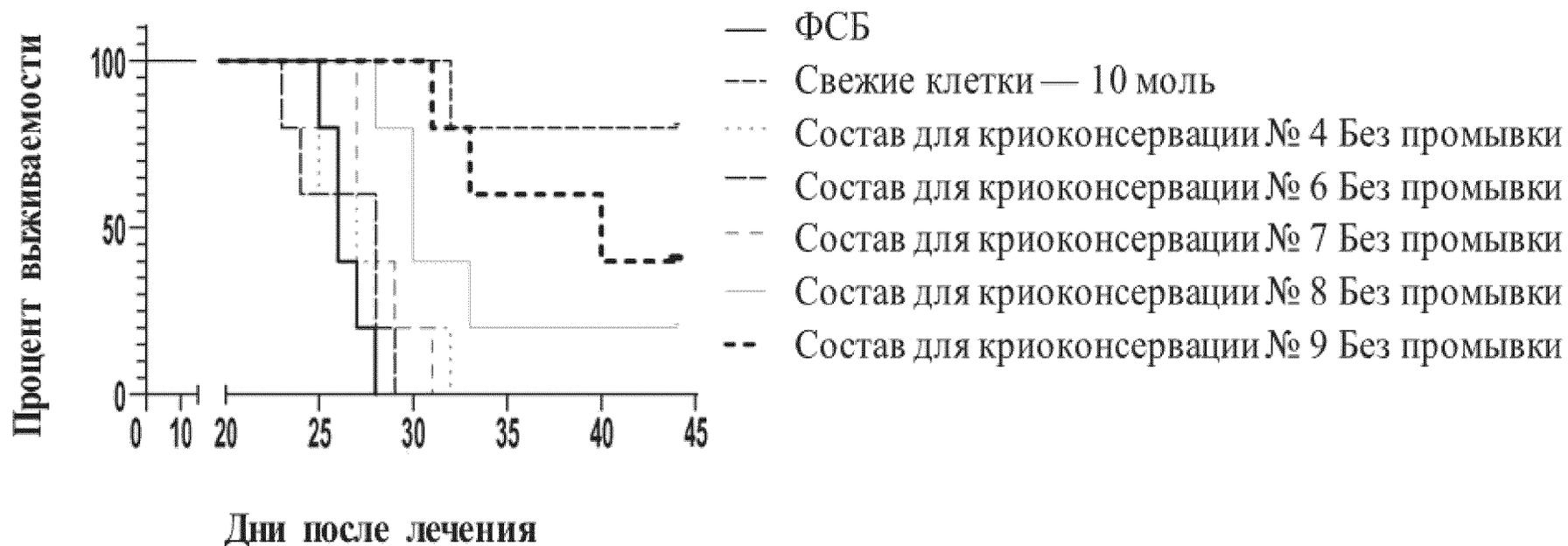
Лечение	Медиана выживаемости	По сравнению со свежими	По сравнению с ФСБ
		р-значение	р-значение
ФСБ	22	Н/П	Н/П
Свежие CAR-NK-клетки — 10 моль	31	Н/П	0,0026
Состав для криоконсервации № 1 Без промывки	29	0,018	0,0026
Состав для криоконсервации № 2 Без промывки	30	0,172	0,0026
Состав для криоконсервации № 3 Без промывки	30	0,445	0,0026
Состав для криоконсервации № 4 Без промывки	31	0,723	0,0084
Состав для криоконсервации № 5 Без промывки	29,5	0,512	0,0062

Фиг. 2С

Состав для криоконсервации № 4	40 % MEM + 50 % CS10 + 10 % HSA
Состав для криоконсервации № 6	40 % MEM + 50 % CS10 + 10 % HSA + 1,5 ммоль глутатиона
Состав для криоконсервации № 7	40 % PLASMA-LYTEA + 50 % CS10 + 10 % HSA + 1,5 ммоль глутатиона
Состав для криоконсервации № 8	38,6 % PLASMA-LYTEA + 50 % CS10 + 10 % HSA + 0,8 % AA + 0,6 % Витамин А + 1,5 ммоль глутатиона
Состав для криоконсервации № 9	40 % PLASMA-LYTEA + 50 % CS10 + 10 % HSA + 30 ммоль трегалозы

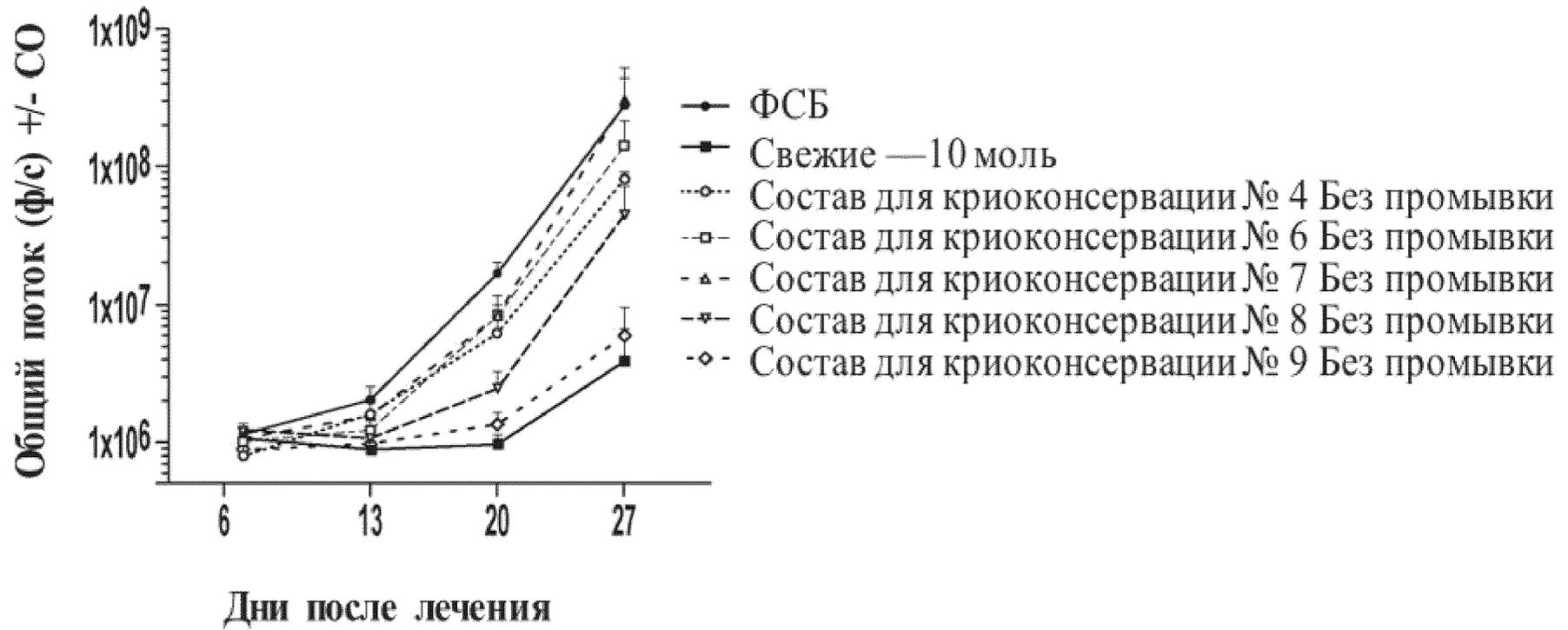
Фиг. 3А

Выживаемость Без промывки



ФИГ.3В

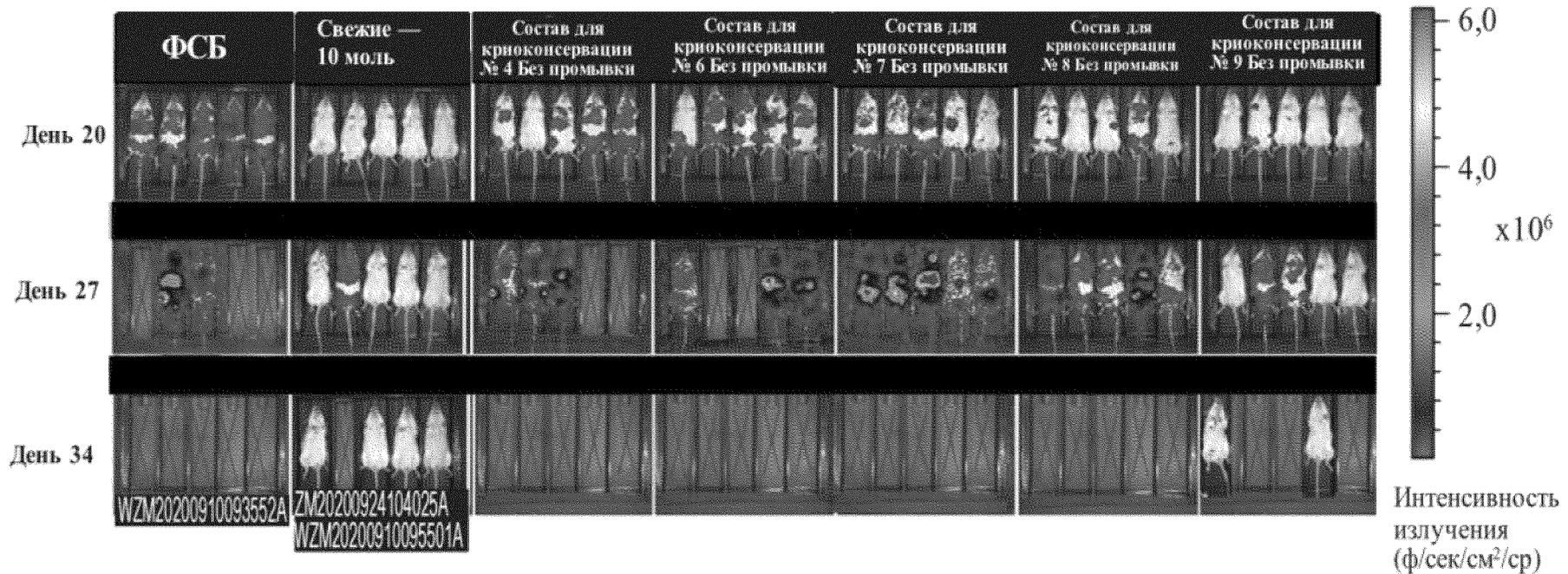
Общий поток



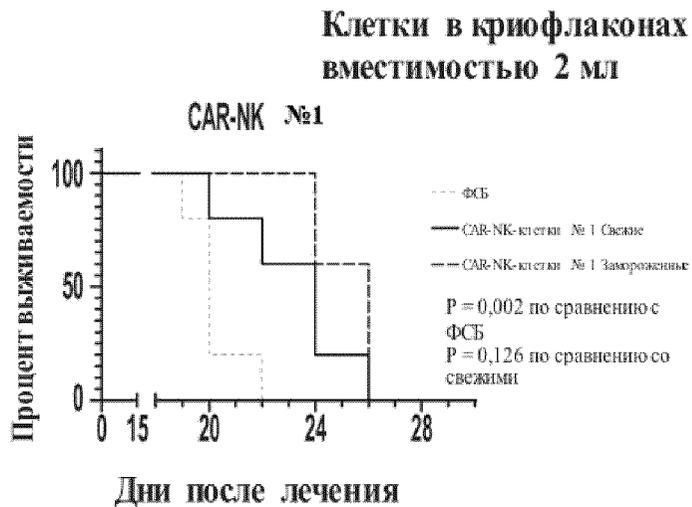
Фиг. 3С

Лечение	Медиана выживаемости	По сравнению со свежими	По сравнению с ФСБ
		р-значение	р-значение
ФСБ	26	Н/П	Н/П
Свежие — 10 моль	Не определена	Н/П	0,002
Состав для криоконсервации № 4 Без промывки	27	0,0044	0,390
Состав для криоконсервации № 6 Без промывки	28	0,0021	0,412
Состав для криоконсервации № 7 Без промывки	28	0,0017	0,052
Состав для криоконсервации № 8 Без промывки	30	0,0589	0,005
Состав для криоконсервации № 9 Без промывки	40	0,2578	0,002

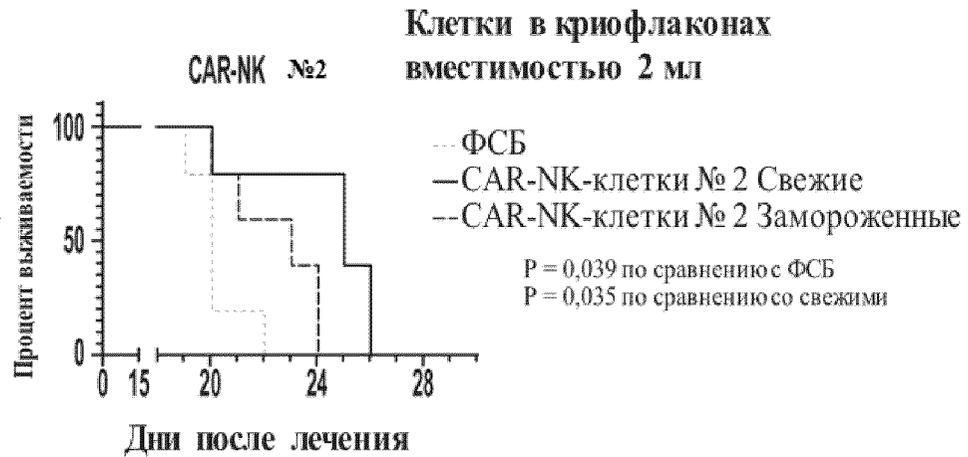
Фиг. 3D



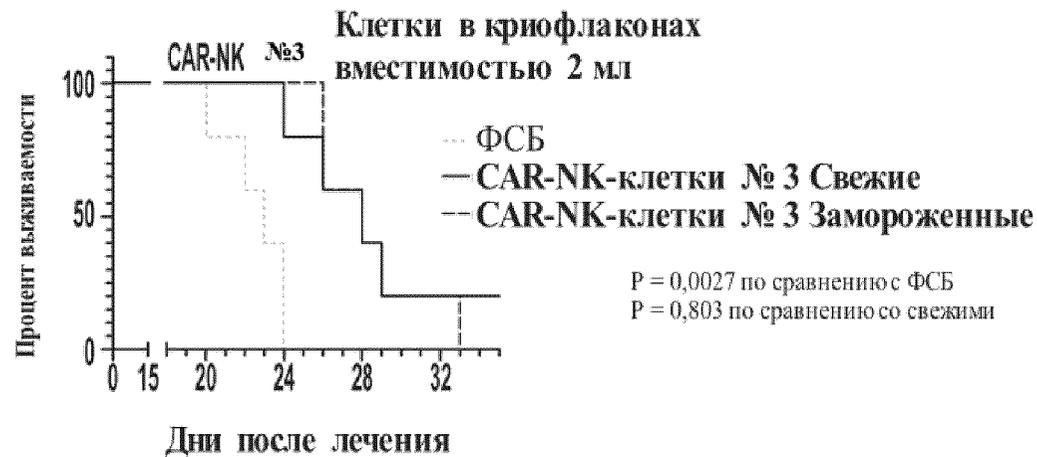
ФИГ.3Е



ФИГ. 4А

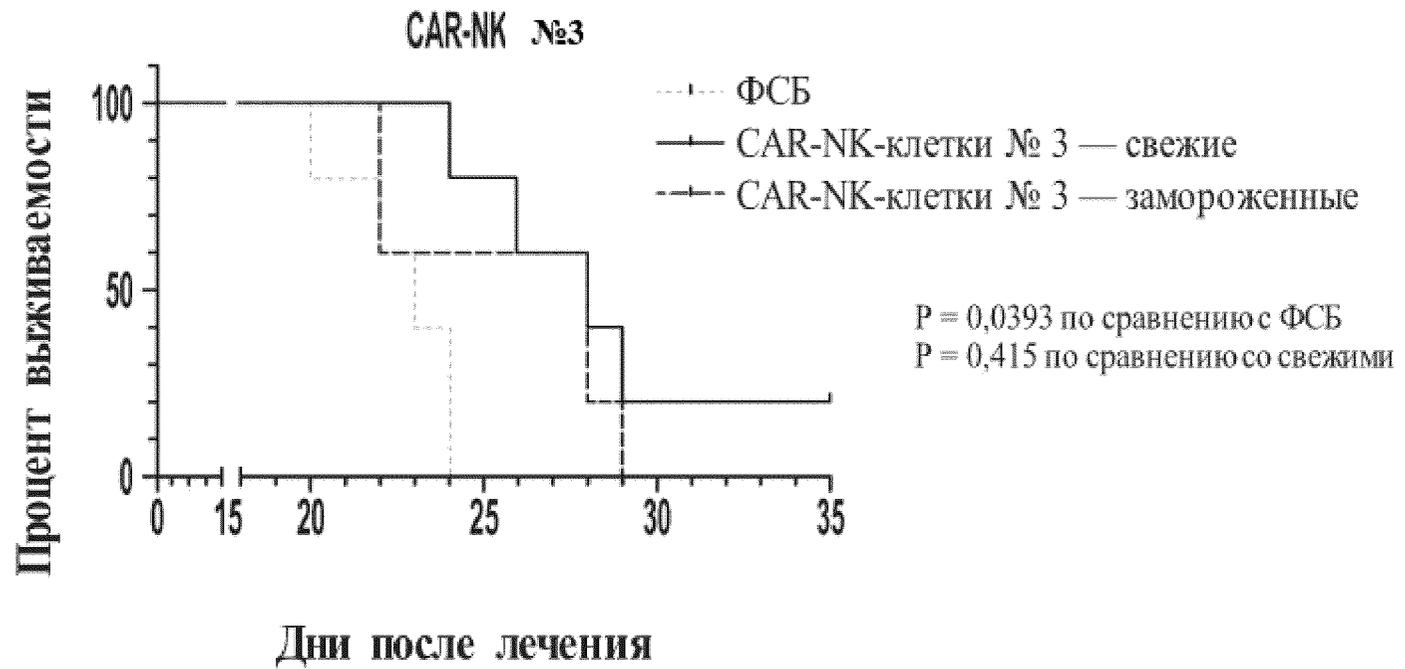


ФИГ.4В

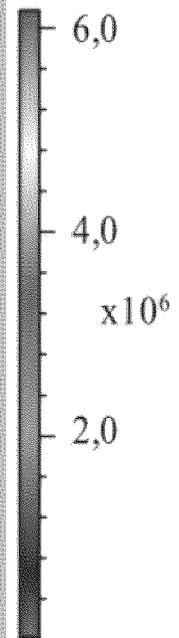
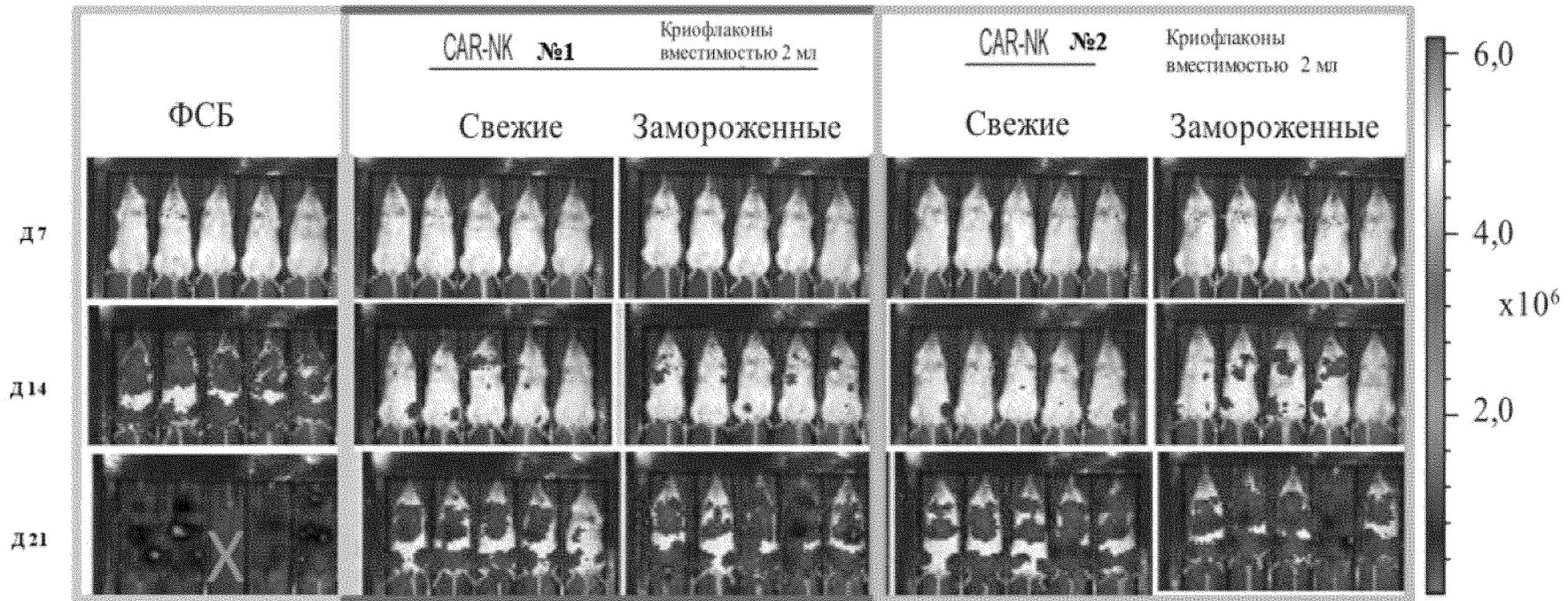


ФИГ.4С

Клетки в АТ-флаконах
емкостью 50 мл



ФИГ.4D

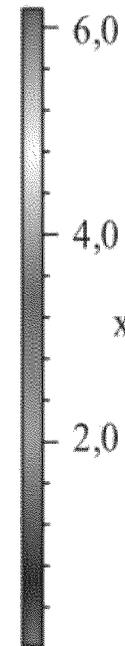
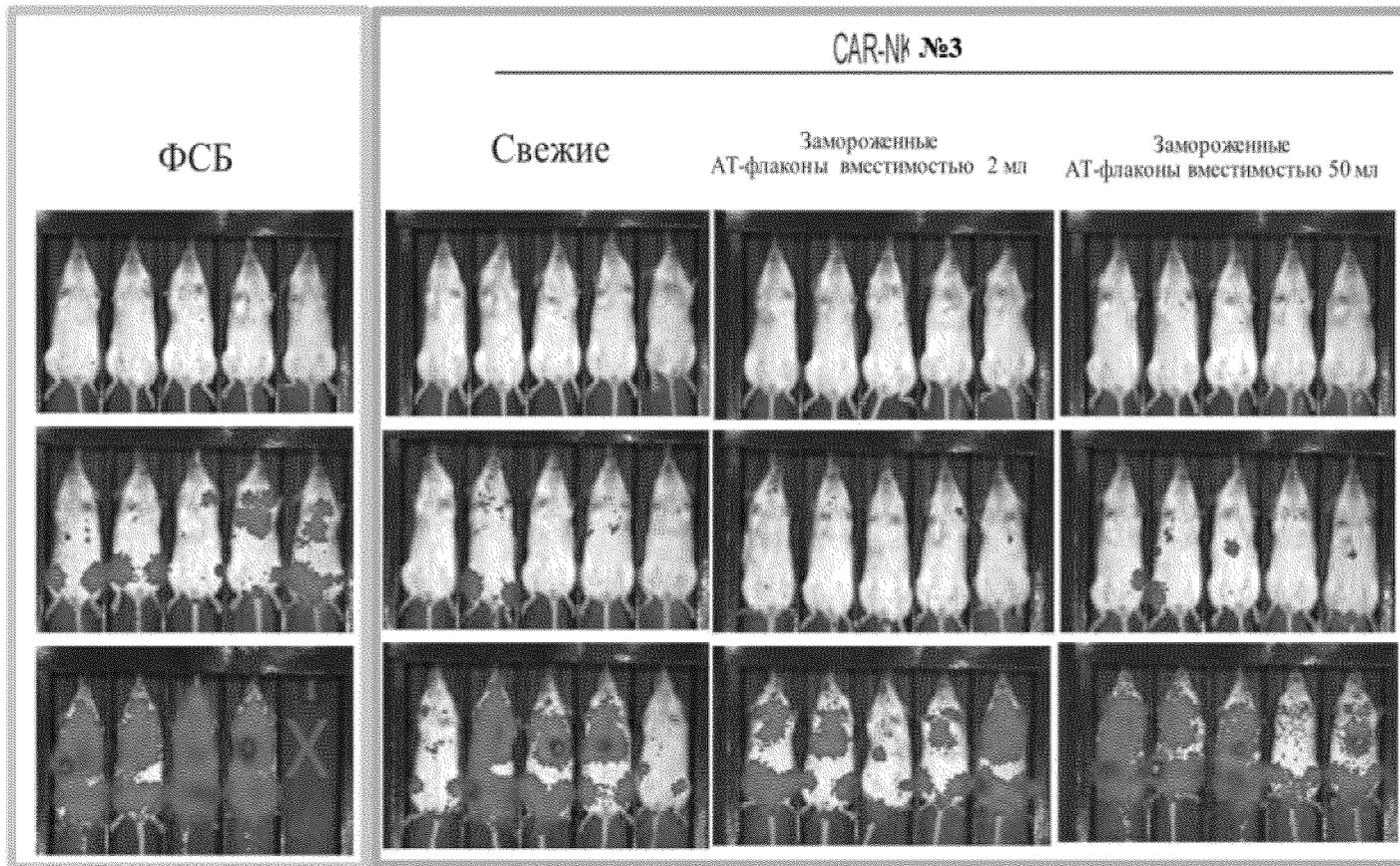


X, животное умерщвлено в связи с прогрессированием опухоли

Интенсивность
излучения
(ф/сек/см²/ср)

Цветовая шкала
Мин. = 9,00e3
Макс. = 6,19e6

ФИГ.4Е

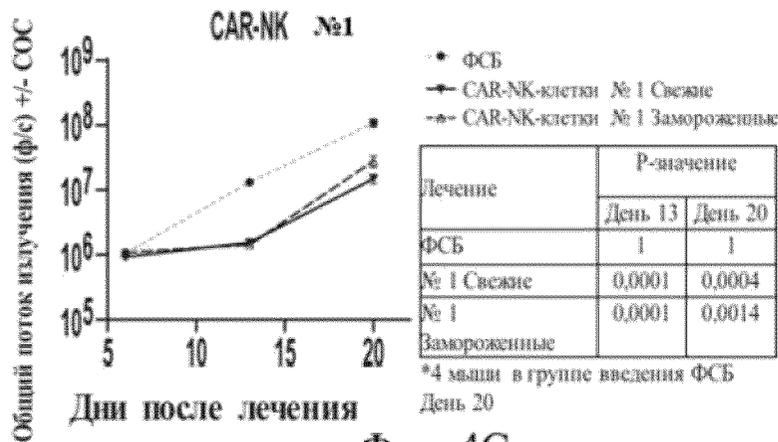


Интенсивность
излучения
(ф/сек/см²/ср)

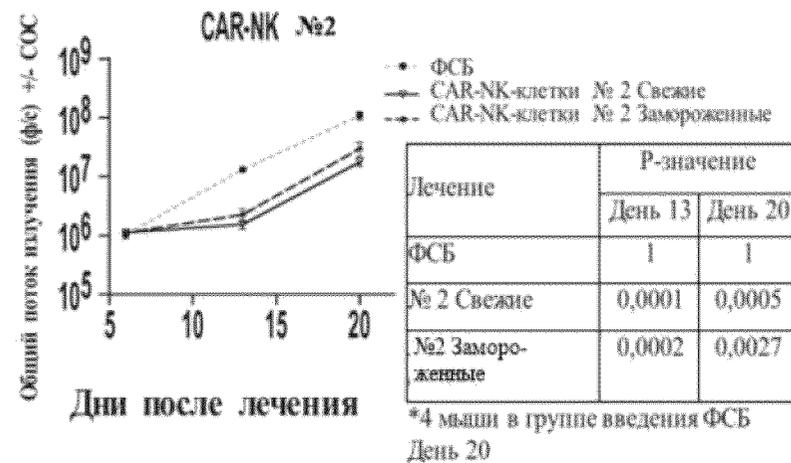
Цветовая шкала
Мин. = 9,00e3
Макс. = 6,19e6

13/22

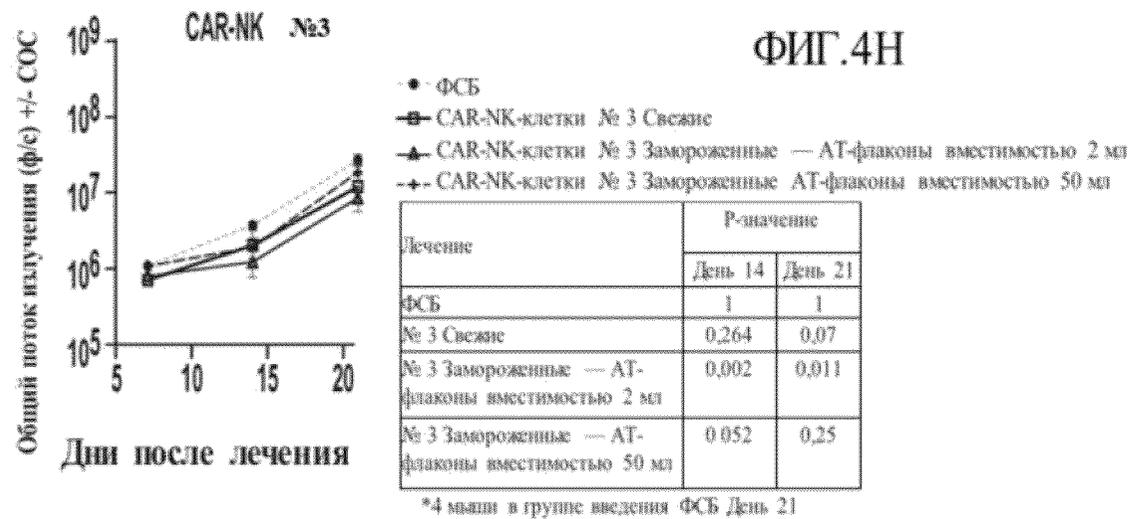
ФИГ.4F



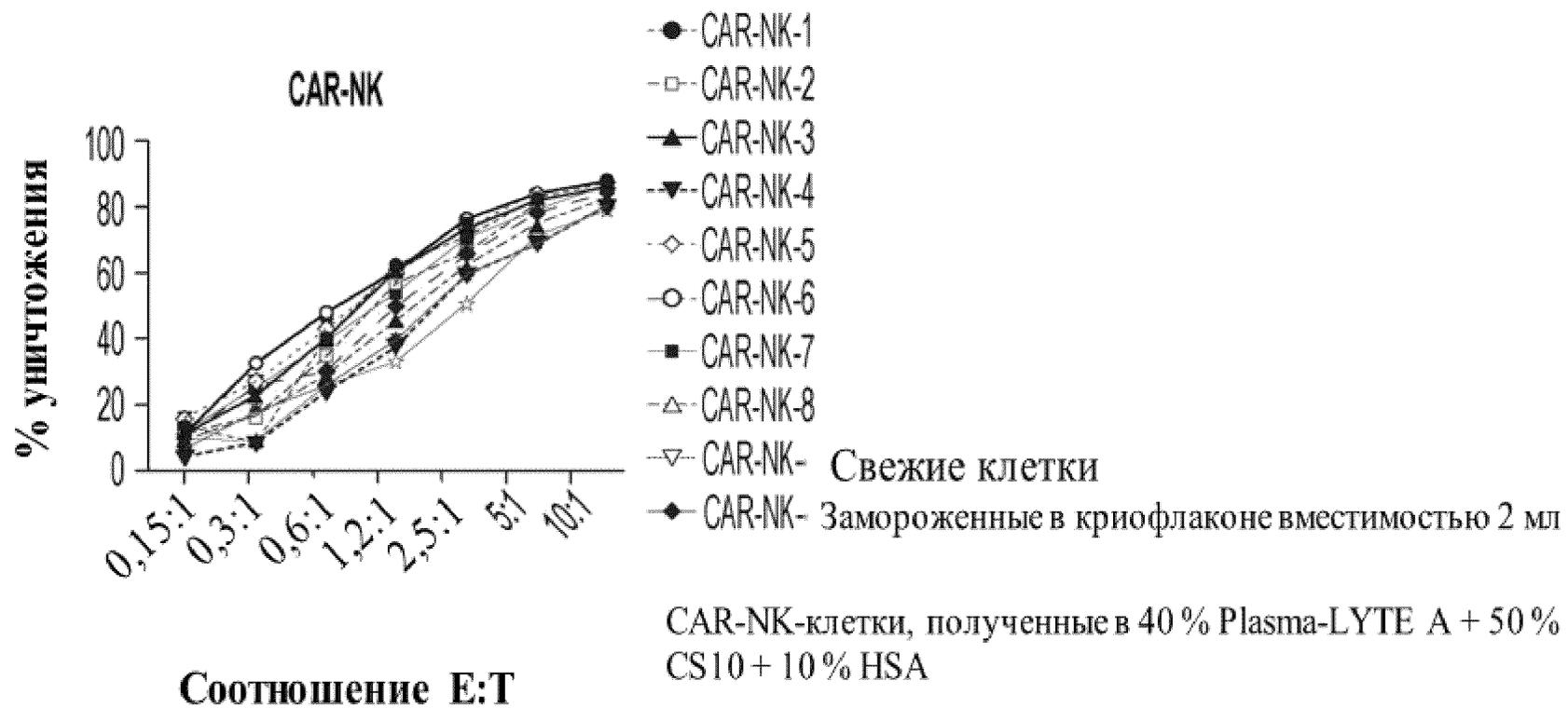
Фиг. 4Г



ФИГ.4Н



Фиг. 4I



Фиг. 5А

Номер образца	Тип контейнера	Концентрация клеток	Объем наполнения (мл)	% уничтожения @ E:T=10:1	Соотношение замороженные/свежие	Жизнеспособность (%)
CAR-NK-1	АТ-флаконы вместимостью 50 мл	120 миллионов/мл	16	87,2	1,04	93,8
CAR-NK-2	АТ-флаконы вместимостью 50 мл	120 миллионов/мл	30	86,6	1,03	93,9
CAR-NK-3	АТ-флаконы вместимостью 50 мл	120 миллионов/мл	45	86,9	1,03	93,8
CAR-NK-4	АТ-флаконы вместимостью 2 мл	120 миллионов/мл	1,0	79,7	0,95	93,7
CAR-NK-5	АТ-флаконы вместимостью 50 мл	80 миллионов/мл	16	87,2	1,04	94,0
CAR-NK-6	АТ-флаконы вместимостью 50 мл	80 миллионов/мл	30	87,7	1,04	94,5
CAR-NK-7	АТ-флаконы вместимостью 50 мл	80 миллионов/мл	45	86,5	1,03	94,1
CAR-NK-8	АТ-флаконы вместимостью 2 мл	80 миллионов/мл	1,0	82,7	0,98	93,9
Свежие CAR-NK-клетки	Н/П	Н/П	Н/П	84,0	1,00	98,4
Замороженные	Криофлаконы вместимостью 2 мл	10 миллионов/мл	1,0	84,0	1,00	98,7

Фиг. 5В

АТ-флаконы вместимостью 50 мл,
120 миллионов клеток/мл

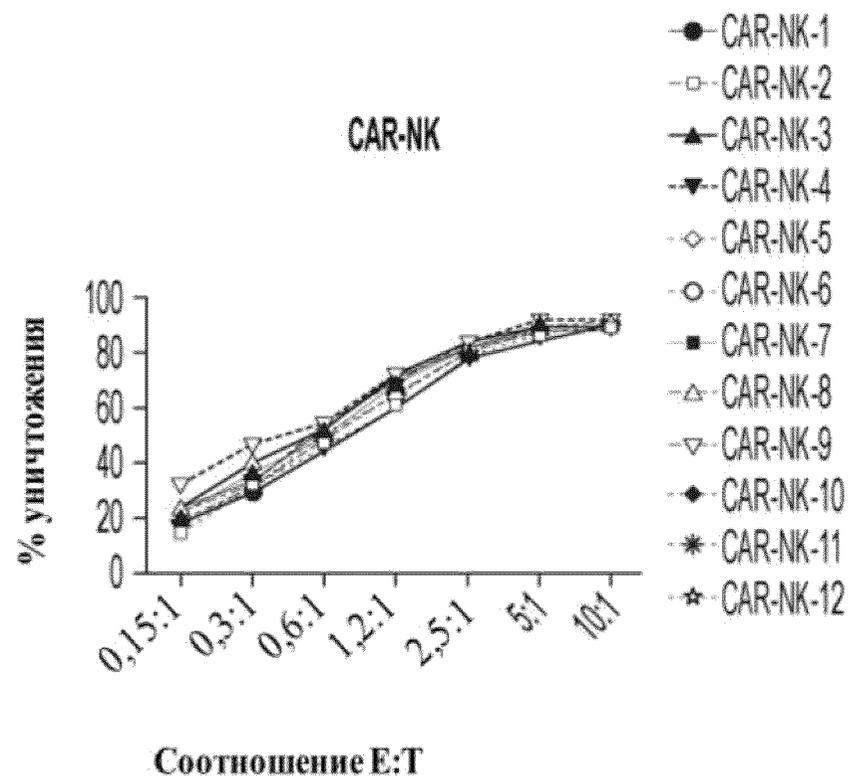
АТ-флаконы вместимостью 50 мл,
80 миллионов клеток/мл

Регистрируемый маркер	CAR-NK-1	CAR-NK-2	CAR-NK-3	CAR-NK-4	CAR-NK-5	CAR-NK-6	CAR-NK-7	CAR-NK-8	Свежие CAR- NK-клетки
	наполнение 16 мл	наполнение 30 мл	наполнение 45 мл	наполнение 1 мл	наполнение 16 мл	наполнение 30 мл	наполнение 45 мл	наполнение 1 мл	
Популяция живых клеток (7AAD)	41,87	42,66	46,43	47,01	46,65	43,86	48,96	42,41	40,80
CD56-CD48+CD32+	0,00	0,00	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
CD56+CD3-	97,84	97,90	98,31	97,51	97,10	98,05	98,06	95,96	98,14
CD3+	0,05	0,07	0,01	0,12	0,09	0,07	0,06	0,10	0,05
F(ab') ₂ +(NK-CAR)+	50,64	49,07	50,48	48,20	50,50	50,19	51,25	48,60	47,93

Фиг. 5С

Номер образца	Тип контейнера	Концентрация клеток	Объем наполнения (мл)	Условия выдержки	Время выдержки	Уничтожение Е/Т 10:1	Жизнеспособность (%)
CAR-NK-1	АТ-флаконы вместимостью 50 мл	110 моль/мл	45	Холодное состояние	30 минут	91,8	96,8
CAR-NK-2	АТ-флаконы вместимостью 50 мл	110 моль/мл	30		30 минут	90,3	97,1
CAR-NK-3	АТ-флаконы вместимостью 50 мл	110 моль/мл	8		30 минут	91,0	97,1
CAR-NK-4	АТ-флаконы вместимостью 2 мл	110 моль/мл	1		30 минут	92,6	97,9
CAR-NK-5	Криофлаконы вместимостью 2 мл	110 моль/мл	1		30 минут	90,2	97,6
CAR-NK-6	АТ-флаконы вместимостью 50 мл	110 моль/мл	18		30 минут	90,2	97,3
CAR-NK-7	АТ-флаконы вместимостью 50 мл	110 моль/мл	30	Холодное состояние	45 минут	88,5	96,9
CAR-NK-8	АТ-флаконы вместимостью 2 мл	110 моль/мл	1		45 минут	91,5	97,3
CAR-NK-9	Криофлаконы вместимостью 2 мл	110 моль/мл	1		45 минут	90,7	97,5
CAR-NK-10	АТ-флаконы вместимостью 50 мл	110 моль/мл	30	Регулируемая комнатная температура (CRT), а затем холодное состояние	10 минут CRT + 30 минут, холодное состояние	91,1	96,8
CAR-NK-11	АТ-флаконы вместимостью 2 мл	110 моль/мл	1		10 минут CRT + 30 минут, холодное состояние	92,6	97,7
CAR-NK-12	Криофлаконы вместимостью 2 мл	110 моль/мл	1		10 минут CRT + 30 минут, холодное состояние	91,7	97,6

ФИГ.5D



ФИГ.5Е

		CAR-NK31 День 25													
Регистрируемый маркер	CAR-NK-1 (АТ-фл. 50 мл)	CAR-NK-2 (АТ-фл. 50 мл)	CAR-NK-3 (АТ-фл. 50 мл)	CAR-NK-4 (АТ-фл. 42 мл)	CAR-NK-5 (Криофлак он)	CAR-NK-6 (АТ-фл. 50 мл)	CAR-NK-7 (АТ-фл. 50 мл)	CAR-NK-8 (АТ-фл. 82 мл)	CAR-NK-9 (криофлак он)	CAR-NK-10 (АТ-фл. 50 мл)	CAR-NK-11 (АТ-фл. 112 мл)	CAR-NK-12 (криофлак он)	CAR-NvL TDN	CAR-NK-D25UTD	
Популяция живых клеток (7AAD-)	58,17	54,62	48,35	55,56	50,53	53,05	55,20	55,15	45,73	54,13	58,35	53,72	50,73	49,34	
CD56-CD48+CD32+	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01	0,00	0,00	
CD56+CD3-	98,36	98,23	98,26	98,32	98,16	98,30	97,97	98,32	97,99	98,18	98,34	98,25	98,31	98,52	
CD3+	0,15	0,12	0,10	0,27	0,21	0,22	0,19	0,11	0,16	0,12	0,10	0,07	0,08	0,08	
F(ab') ₂ +(NK-CAR)+	31,90	28,71	28,17	29,16	30,68	30,70	30,60	29,27	28,91	28,56	29,18	30,93	22,41	3,73	
CD56+CD16+	25,53	25,59	28,77	31,99	24,63	39,80	28,31	38,15	19,82	26,76	32,71	22,16	26,57	35,81	
CD3-CD56+CD16+	26,06	26,06	29,24	32,38	25,08	40,25	28,69	38,57	20,31	27,22	33,04	22,59	26,85	36,14	

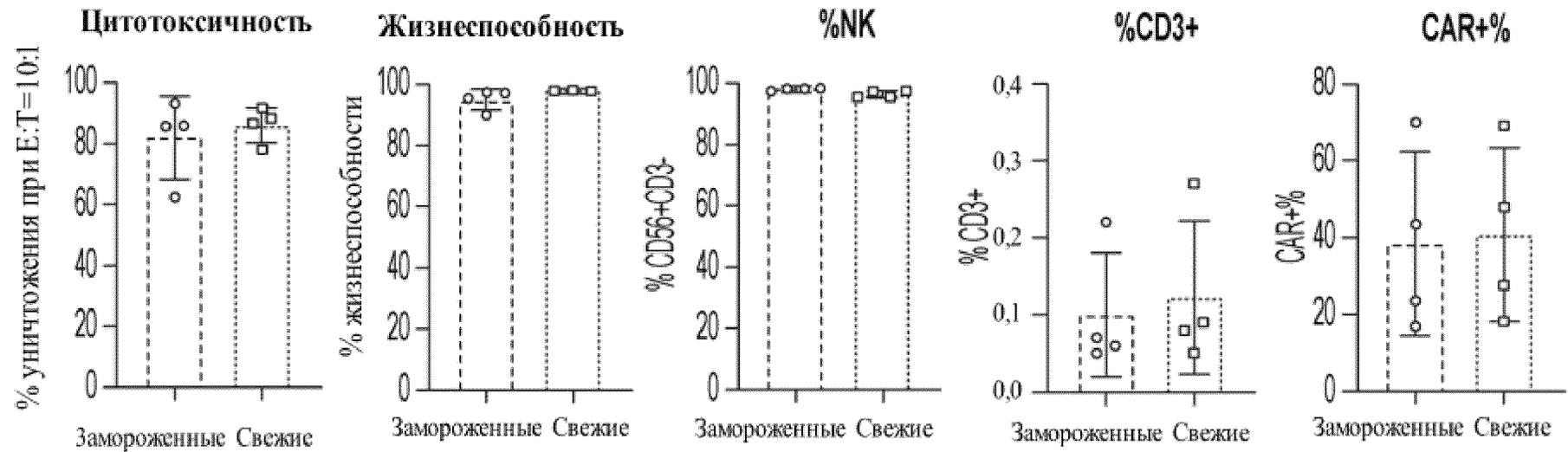
20/22

Фиг. 5F

CD19+	0,02	0,01	0,02	0,00	0,08	0,09	0,08	0,09	0,05	0,03	0,04	0,03	0,00	0,00
CD14+	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01	0,00	0,00	0,00
Жизнеспособные CD45+	74,36	78,22	80,29	81,33	68,37	80,46	75,77	79,67	71,01	81,05	81,19	72,84	64,43	62,68
CD45+	96,47	97,23	97,61	97,14	95,33	97,31	96,18	97,03	96,15	97,34	96,76	95,50	93,69	93,62
НК-клетки	96,48	96,29	96,22	96,21	95,61	96,04	95,34	96,49	95,66	96,00	96,45	95,80	95,19	95,43

Фиг. 5F
ПРОДОЛЖЕНИЕ

Составлено в концентрации 10 моль/мл в криофлаконах вместимостью 2 мл / 40 % Plasmalyte + 50 % CS10 + 10 % HSA + 30 ммоль трегалозы



22/22

Каждая точка обозначает 1 донора/серию/прогон

Сравнение эффективности, жизнеспособности, содержания CAR-NK+, содержания NK-CAR+ и примесей CD3+ *in vitro* в криоконсервированных клетках и свежих клетках

Фиг. 6