

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202392253 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2024.02.15

(51) Int. Cl. A01N 1/02 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2022.02.09

(54) СПОСОБЫ И КОМПОЗИЦИИ ДЛЯ ЗАМОРАЖИВАНИЯ И РАЗМОРАЖИВАНИЯ
КЛЕТОК МЛЕКОПИТАЮЩИХ

(31) 63/147,737; PCT/US22/15627

(72) Изобретатель:

(32) 2021.02.09; 2022.02.08

Чжоу Шуся, Цао Лань, Гао Даюн, Сюэ
Цюн, Сунь Цзюсун, Чжу Хуан (US)

(33) US

(86) PCT/US2022/015870

(74) Представитель:

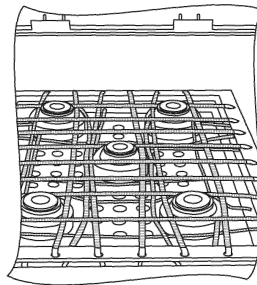
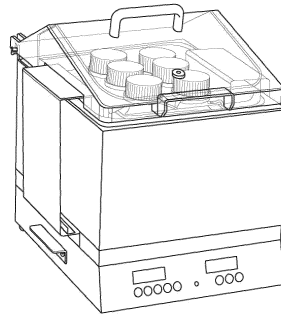
(87) WO 2022/173867 2022.08.18

Медведев В.Н. (RU)

(71) Заявитель:

ТАКЕДА ФАРМАСЬЮТИКАЛ
КОМПАНИ ЛИМИТЕД (JP)

(57) В настоящем изобретении представлен, в частности, способ криоконсервации и размораживания клеток, в результате которого размороженные клетки обладают высокой жизнеспособностью и функциональностью после размораживания. В некоторых вариантах осуществления предлагается крупномасштабный способ криоконсервации клеток, включающий в себя: (a) приведение клеток в контакт со средой для криоконсервации; (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.



A1

202392253

202392253

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-578817EA/061

СПОСОБЫ И КОМПОЗИЦИИ ДЛЯ ЗАМОРАЖИВАНИЯ И РАЗМОРАЖИВАНИЯ КЛЕТОК МЛЕКОПИТАЮЩИХ

ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННУЮ ЗАЯВКУ

[0001] Настоящая заявка испрашивает приоритет предварительной заявки на патенты США с серийным номером 63/147 737, поданной 9 февраля 2021 г., и РСТ/US2022/015627, поданной 8 февраля 2022 г., содержание которых включено в настоящий документ посредством ссылки в полном объеме для всех целей.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[2] Криоконсервация биологического материала, такого как клетки, ткани, органы, продукты крови, эмбрионы, сперматозоиды, стволовые клетки, икринки рыб и т. д., подразумевает замораживание биологического материала до достаточно низких температур, при которых химические процессы, которые в противном случае могли бы повредить материал, останавливаются, тем самым сохраняя материал.

[3] Целью криоконсервации часто является не только замораживание биологических материалов, но и сохранение их жизнеспособности, т. е. способности возобновлять нормальную биологическую функцию после размораживания. При замораживании биологического материала жидкость внутри него обычно претерпевает фазовый переход, в ходе которого могут образовываться кристаллы льда. Образование кристаллов льда может привести к повреждению биологического материала, в результате чего он может оказаться нежизнеспособным после размораживания.

[4] Поэтому желательна оптимизация условий криоконсервации, особенно при криоконсервации клеток, используемых для терапии, с целью обеспечения выживаемости клеток, которые могут быть отправлены для использования в различных областях, например, для клеточной терапии, регенеративной медицины, тканевой инженерии и многих других биомедицинских целей.

[5] Неоптимальная криоконсервация может привести к различиям в жизнеспособности и функциональности клеток в разных сериях, снижению производительности клеток, а также к возможному отбору субпопуляций с генетическими или эпигенетическими характеристиками, отличающимися от исходных клеток. Нормативные требования также влияют на криоконсервацию, поскольку они предполагают надежный и воспроизводимый подход к замораживанию, хранению и размораживанию продукта.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[6] В основе настоящей заявки, по меньшей мере частично, лежат способы и композиции для эффективного замораживания и размораживания клеток млекопитающих. Настоящее изобретение основано, частично, на разработке крупномасштабного способа криоконсервации/размораживания, который в целом применим к клеткам млекопитающих, например, к иммунным клеткам, и, в частности, сконструированным

иммунным клеткам, пригодным для клеточной терапии. В настоящей заявке раскрыт способ замораживания, включающий в себя различные этапы охлаждения, нагревания и выдерживания, который позволяет криоконсервировать клетки, обладающие высокой жизнеспособностью и функциональностью после размораживания. Кроме того, описанные в настоящем документе способы замораживания/размораживания позволяют последовательно замораживать содержащий клетки образец в больших масштабах (например, объемом более 10 мл) за время менее или около 60 минут, а также непосредственно вводить размороженный образец клеток нуждающемуся в этом субъекту, как описано в настоящем документе.

[7] Например, как более подробно описано ниже, описанные в настоящем документе способы позволяют сохранять функции иммунных клеток *in vitro* и *in vivo*, по меньшей мере, сопоставимые со свежeweделенными клетками. Кроме того, представленные в настоящем документе способы и композиции могут быть использованы для сохранения больших объемов иммунных клеток, особенно аллогенных сконструированных иммунных клеток, пригодных для клеточной терапии, например, для хранения и транспортировки в банки клеток или больницы, где клетки могут быть использованы для дальнейшего культивирования и проведения анализов или могут быть введены непосредственно нуждающемуся в них пациенту. Таким образом, в настоящей заявке представлены способы замораживания и размораживания, которые могут быть высокоэффективными для консервации большого объема клеток млекопитающих и, в частности, сконструированных иммунных клеток, пригодных для клеточной терапии.

[8] В некоторых аспектах предлагается крупномасштабный способ криоконсервации иммунных клеток, включающий в себя: (а) обеспечение контейнера, содержащего образец, включающий в себя иммунные клетки, суспендированные в среде для криоконсервации, причем объем образца по меньшей мере на 5% меньше полной 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 (с) хранение клеток в паровой фазе жидкого азота, что обеспечивает криоконсервацию иммунных клеток.

[9] В некоторых вариантах осуществления регулируемая скорость для минимизации скрытой теплоты плавления включает в себя два или более этапов снижения температуры со скоростью от $0,75\text{ }^{\circ}\text{C}$ в минуту до $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ в минуту до конечной температуры $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ или ниже.

[10] В некоторых вариантах осуществления общее время для достижения криоконсервации иммунных клеток составляет менее 120 минут, менее 110 минут, менее 100 минут, менее 90 минут, менее 80 минут, менее 70 минут или менее 60 минут. Соответственно, в некоторых вариантах осуществления общее время для достижения криоконсервации иммунных клеток составляет менее 120 минут. В некоторых вариантах

осуществления общее время для достижения криоконсервации иммунных клеток составляет менее 110 минут. В некоторых вариантах осуществления общее время для достижения криоконсервации иммунных клеток составляет менее 100 минут. В некоторых вариантах осуществления общее время для достижения криоконсервации иммунных клеток составляет менее 90 минут. В некоторых вариантах осуществления общее время для достижения криоконсервации иммунных клеток составляет менее 80 минут. В некоторых вариантах осуществления общее время для достижения криоконсервации иммунных клеток составляет менее 70 минут. В некоторых вариантах осуществления общее время для достижения криоконсервации иммунных клеток составляет менее 60 минут.

[11] В некоторых вариантах осуществления иммунные клетки являются свежевыделенными или по меньшей мере однократно замороженными и размороженными.

[12] В некоторых вариантах осуществления иммунные клетки представляют собой естественные или сконструированные натуральные клетки-киллеры (NK-клетки), альфа/бета-T-клетки, гамма/дельта-T-клетки, регуляторные T-клетки (Tрег), индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (иПСК), T- или NK-клетки, полученные из иПСК, гемопоэтические стволовые клетки (ГСК), мезенхимальные стромальные клетки (МСК), дендритные клетки, макрофаги или В-клетки. Соответственно, в некоторых вариантах осуществления иммунные клетки представляют собой естественные NK-клетки или сконструированные NK-клетки. В некоторых вариантах осуществления иммунные клетки представляют собой сконструированные NK-клетки. В некоторых вариантах осуществления иммунные клетки представляют собой альфа-бета T-клетки. В некоторых вариантах осуществления иммунные клетки представляют собой гамма-дельта. В некоторых вариантах осуществления иммунные клетки представляют собой Tрег. В некоторых вариантах осуществления иммунные клетки представляют собой иПСК. В некоторых вариантах осуществления иммунные клетки представляют собой T-клетки, полученные из иПСК. В некоторых вариантах осуществления иммунные клетки представляют собой NK-клетки, полученные из иПСК. В некоторых вариантах осуществления иммунные клетки представляют собой ГСК. В некоторых вариантах осуществления иммунные клетки представляют собой МСК. В некоторых вариантах осуществления иммунные клетки представляют собой дендритные клетки. В некоторых вариантах осуществления иммунные клетки представляют собой макрофаги. В некоторых вариантах осуществления иммунные клетки представляют собой В-клетки.

[13] В некоторых вариантах осуществления иммунные клетки представляют собой NK-клетки, полученные из пуповинной крови, сконструированные с химерным антигенным рецептором (CAR).

[14] 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 В-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.

[15] 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.

[16] 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 НК-клетки сконструированы с возможностью экспрессии урацилфосфорибозилтрансферазы (UPRTase). В некоторых вариантах осуществления НК-клетки сконструированы с возможностью экспрессии цитозиндеаминазы (CD).

[17] В некоторых вариантах осуществления НК-клетки сконструированы с возможностью экспрессии CD19 CAR, IL-15 и iCaspase9.

[18] В некоторых вариантах осуществления НК-клетки представляют собой генетически сконструированные НК-клетки из пуповинной крови, включающие 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.

[19] В одном варианте осуществления генетически сконструированные НК-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.

[20] В некоторых вариантах осуществления полная вместимость контейнера составляет около 50 мл.

[21] В некоторых вариантах осуществления полная вместимость контейнера составляет около 50 мл, а объем образца - менее 40 мл.

[22] В некоторых вариантах осуществления объем образца составляет около 10 мл, около 15 мл, около 20 мл, около 25 мл, около 30 мл, около 31 мл, около 32 мл, около 33 мл, около 34 мл, около 35 мл, около 36 мл, около 37 мл, около 38 мл, около 39 мл, около 40 мл, около 41 мл, около 42 мл, около 43 мл, около 44 мл или около 45 мл. Соответственно, в некоторых вариантах осуществления объем образца составляет около 10 мл. В некоторых вариантах осуществления объем образца составляет около 15 мл. В некоторых вариантах осуществления объем образца составляет около 20 мл. В некоторых

вариантах осуществления объем образца составляет около 15 мл. В некоторых вариантах осуществления объем образца составляет около 25 мл. В некоторых вариантах осуществления объем образца составляет около 30 мл. В некоторых вариантах осуществления объем образца составляет около 35 мл. В некоторых вариантах осуществления объем образца составляет около 40 мл. В некоторых вариантах осуществления объем образца составляет около 45 мл.

[23] В некоторых вариантах осуществления контейнер представляет собой криофлакон или криомешок. Соответственно, в некоторых вариантах осуществления контейнер представляет собой криофлакон. В некоторых вариантах осуществления контейнер представляет собой криомешок.

[24] В некоторых вариантах осуществления внутренний размер криофлаконов составляет от около 10 мм до около 18 мм. В некоторых вариантах осуществления внешний размер криофлаконов составляет от около 15 мм до около 40 мм.

[25] В некоторых вариантах осуществления внутренний размер криофлаконов составляют около 13,5 мм.

[26] В некоторых вариантах осуществления высота криофлаконов составляет от около 40 мм до 50 мм. В некоторых вариантах осуществления высота криофлаконов составляет от около 30 мм до 90 мм.

[27] В некоторых вариантах осуществления высота криофлаконов составляет около 48,3 мм.

[28] В некоторых вариантах осуществления контейнер является резистентным к ДМСО.

[29] В некоторых вариантах осуществления иммунные клетки присутствуют в концентрации от около 6 до 120 миллионов клеток на мл. В некоторых вариантах осуществления иммунные клетки присутствуют в концентрации от около 6 до 25 миллионов клеток на мл.

[30] В некоторых вариантах осуществления среда для криоконсервации содержит криопротектор, альбумин, дисахарид, а также непирогенный и изотонический кристаллоидный раствор.

[31] 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.

[32] В некоторых аспектах предлагается крупномасштабный способ размораживания криоконсервированных иммунных клеток, включающий в себя: (a) нагревание водяной бани до температуры от 37 °C до 70 °C; (b) перенос контейнера, содержащего криоконсервированные иммунные клетки, в предварительно нагретую водяную баню; и (c) перемешивание содержимого контейнера со скоростью от около 100 до около 250 об./мин в течение подходящего периода времени, тем самым обеспечивая размораживание иммунных клеток. В некоторых вариантах осуществления температура водяной бани составляет от около 55 °C до 65 °C. В некоторых вариантах осуществления

перемешивание содержимого контейнера выполняют со скоростью от около 100 до 150 об./мин.

[33] В некоторых вариантах осуществления подходящий период времени составляет от 5 до 15 минут.

[34] В некоторых вариантах осуществления подходящий период времени составляет около 10 минут.

[35] В некоторых вариантах осуществления перемешивание выполняют в водяной бане с орбитальным шейкером.

[36] В некоторых вариантах осуществления перемешивание клеток в водяной бане с орбитальным шейкером выполняют со скоростью около 120-150 об./мин..

[37] В одном варианте осуществления клетки перемешивают со скоростью 125 об./мин в водяной бане при температуре 60 °С в течение 10 минут.

[38] В некоторых вариантах осуществления температура в водяной бани с орбитальным шейкером составляет около 50 °С, 55 °С, 60 °С, 65 °С, 70 °С или 75 °С. Соответственно, в некоторых вариантах осуществления температура в водяной бане с орбитальным шейкером составляет около 50 °С. В некоторых вариантах осуществления температура в водяной бани с орбитальным шейкером составляет около 55 °С. В некоторых вариантах осуществления температура в водяной бани с орбитальным шейкером составляет около 60 °С. В некоторых вариантах осуществления температура в водяной бани с орбитальным шейкером составляет около 65 °С. В некоторых вариантах осуществления температура в водяной бани с орбитальным шейкером составляет около 70 °С. В некоторых вариантах осуществления температура в водяной бани с орбитальным шейкером составляет около 75 °С.

[39] В некоторых вариантах осуществления полная вместимость контейнера составляет около 50 мл, а объем образца - от около 8 мл до 45 мл.

[40] В некоторых вариантах осуществления жизнеспособность размороженных иммунных клеток после размораживания составляет 90%, 95%, 97% или более. Соответственно, в некоторых вариантах осуществления жизнеспособность размороженных иммунных клеток после размораживания составляет 90%. В некоторых вариантах осуществления жизнеспособность размороженных иммунных клеток после размораживания составляет 95%. В некоторых вариантах осуществления жизнеспособность размороженных иммунных клеток после размораживания составляет 97%. В некоторых вариантах осуществления жизнеспособность размороженных иммунных клеток после размораживания составляет более 97%.

[41] В некоторых вариантах осуществления размороженные иммунные клетки сохраняют функции *in vitro* и/или *in vivo*, аналогичные функциям свежесыведенных иммунных клеток.

[42] В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает в себя этап введения размороженных иммунных клеток нуждающемуся в этом субъекту.

[43] В некоторых аспектах представлен способ изменения температуры образца,

содержащего иммунные клетки, от первой температуры выше температуры замораживания образца до конечной температуры ниже или равной $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, тем самым обеспечивая криоконсервацию образца при конечной температуре, причем способ включает в себя следующие этапы: (а) помещение образца при первой температуре выше температуры замораживания 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; (с) 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; (е) 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 ниже или равна $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

[44] В некоторых вариантах осуществления первая температура составляет от около $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ до $1\text{ }^{\circ}\text{C}$. В некоторых вариантах осуществления первая температура составляет около $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. В некоторых вариантах осуществления первая температура составляет около $3\text{ }^{\circ}\text{C}$. В некоторых вариантах осуществления первая температура составляет около $2\text{ }^{\circ}\text{C}$. В некоторых вариантах осуществления первая температура составляет около $1\text{ }^{\circ}\text{C}$.

[45] В некоторых вариантах осуществления первая регулируемая скорость составляет от около $0,75\text{ }^{\circ}\text{C}$ до $1,25\text{ }^{\circ}\text{C}$ в минуту.

[46] В некоторых вариантах осуществления вторая температура составляет около $-2\text{ }^{\circ}\text{C}$.

[47] В некоторых вариантах осуществления вторая регулируемая скорость составляет от около $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ до $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ в минуту.

[48] В некоторых вариантах осуществления третья температура составляет около $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$.

[49] В некоторых вариантах осуществления третья регулируемая скорость составляет от около $5\text{ }^{\circ}\text{C}$ до $15\text{ }^{\circ}\text{C}$ в минуту.

[50] В некоторых вариантах осуществления четвертая температура составляет около $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$.

[51] В некоторых вариантах осуществления четвертая регулируемая скорость составляет от $0,75\text{ }^{\circ}\text{C}$ до $1,25\text{ }^{\circ}\text{C}$ в минуту.

[52] В некоторых вариантах осуществления пятая температура составляет около $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$.

[53] В некоторых вариантах осуществления пятая регулируемая скорость составляет от $7\text{ }^{\circ}\text{C}$ до $15\text{ }^{\circ}\text{C}$ в минуту.

[54] В некоторых вариантах осуществления конечная температура меньше или равна $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

[55] В некоторых аспектах представлен способ криоконсервации сконструированных иммунных клеток, пригодных для клеточной терапии, включающий в себя (1) обеспечение контейнера, содержащего образец иммунных клеток, суспендированных в среде для криоконсервации, причем объем образца по меньшей мере на 5% меньше полной вместимости контейнера, при этом объем образца составляет по меньшей мере 10 мл; и (2) поэтапное замораживание популяции сконструированных иммунных клеток при регулируемой скорости для минимизации воздействия скрытой теплоты плавления, причем поэтапное замораживание включает в себя охлаждение клеток со скоростью от 0,75 °C в минуту до 30 °C в минуту до конечной температуры -80 °C или ниже, тем самым обеспечивая криоконсервацию клеток.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

[56] На **ФИГ. 1А** представлена схема иллюстративной водяной бани с орбитальным шейкером с регулируемой скоростью вращения и температурой. На **ФИГ. 1В** представлена схема иллюстративной камеры для образцов орбитального шейкера с держателями для размещения криоконтейнеров или флаконов для быстрого размораживания криоконсервированных клеток.

[57] На **ФИГ. 2** представлен график, отражающий профиль замораживания 45 мл состава плацебо без клеток с использованием протокола замораживания большого объема, как описано в примере 1.

[58] На **ФИГ. 3** представлен график, отражающий профиль замораживания 36 мл CAR-NK-клеток с использованием 60-минутного протокола замораживания, как описано в настоящем документе, в частности в примере 2. CAR-NK-клетки были заморожены в устройстве для замораживания с регулируемой скоростью.

[59] На **ФИГ. 4** представлен график, отражающий профиль замораживания пяти AT-флаконов вместимостью 50 мл, каждый из которых содержит 16 мл, 30 мл и 45 мл T-клеток, индуцированных CAR (в данной спецификации иногда именуемых iCART). На схеме в левом нижнем углу показано расположение флаконов вместимостью 50 мл в устройстве для замораживания. Обозначение USB означает размещение флаконов в устройстве для замораживания.

[60] На **ФИГ. 5А** представлен график профиля размораживания 45 мл и 30 мл замороженных iCART при концентрации 80 миллионов клеток в мл в водяной бане с орбитальным шейкером при температуре 60 °C, причем скорость вращения орбитального шейкера установлена на 150 об./мин. На **ФИГ. 5В** представлен график профиля размораживания 45 мл, 30 мл и 16 мл замороженных iCART при концентрации 120 миллионов клеток в мл в водяной бане с орбитальным шейкером при температуре 60 °C, причем скорость вращения орбитального шейкера установлена на 150 об./мин.

[61] На **ФИГ. 6** представлен график, показывающий жизнеспособность клеток iCART, замороженных с использованием описанной в настоящем документе процедуры замораживания и размораживания.

[62] На **ФИГ. 7А** представлен график сопоставимой эффективности гибели *in vitro*

в зависимости от соотношения Е:Т (эффекторные клетки:клетки-мишени) замороженных CAR-NK-клеток в АТ-флаконах вместимостью 50 мл при различном объеме заполнения и при концентрации в 80 миллионов и 120 миллионов клеток на мл с использованием описанной в настоящем документе процедуры замораживания и размораживания в сравнении со свежими клетками, а также с криофлаконом вместимостью 2 мл и АТ-флаконом вместимостью 2 мл. **На ФИГ. 7В** представлена таблица, отражающая фенотипы замороженных, а затем размороженных CAR-NK-клеток.

[63] **На ФИГ. 8А** представлена серия графиков, демонстрирующих сопоставимую эффективность гибели *in vitro* в зависимости от соотношения Е:Т CAR-NK-клеток при концентрации в 6 миллионов и 80 миллионов клеток на мл с использованием описанной в настоящем документе процедуры замораживания и размораживания в виде замороженных клеток в криофлаконах вместимостью 2 мл в качестве эталонных клеток. **На ФИГ. 8В** и **ФИГ. 8С** представлены сводные данные, демонстрирующие высокую ($\geq 96\%$) и сопоставимую жизнеспособность, эффективность гибели и фенотипирование большого объема клеток во флаконах вместимостью 50 мл в качестве эталонных клеток в криофлаконах вместимостью 2 мл.

На ФИГ. 9А-9С представлена серия графиков, отражающих процентную выживаемость *in vivo* мышинных опухолевых моделей, в которые вводили однократно замороженные и впоследствии размороженные CAR-NK-клетки. На графиках показана выживаемость животных с мышинной опухолевой моделью после введения однократно замороженных и впоследствии размороженных CAR-NK-клеток (суспензии клеток № 1-3) в сравнении с плацебо (среда для замораживания без клеток), а также в сравнении с клетками, представляющими собой восстановленные свежие CAR-NK-клетки. **На ФИГ. 9А** показан процент выживаемости животных после введения CAR-NK-клеток (суспензия клеток № 1). **На ФИГ. 9В** показан процент выживаемости животных после введения CAR-NK-клеток в мышинные опухолевые модели. **На ФИГ. 9С** показан процент выживаемости животных после введения CAR-NK-клеток в мышинную опухолевую модель.

На ФИГ. 9D-9F представлена серия графиков, показывающих суммарный поток люциферазной флуоресценции в мышинных опухолевых моделях *in vivo*, в которые вводили однократно замороженные и впоследствии размороженные CAR-NK-клетки (клеточные суспензии № 1-3), в сравнении с плацебо (среда для замораживания без клеток) и в сравнении с восстановленными свежими CAR-NK-клетками.

На ФИГ. 9G представлена серия изображений, демонстрирующих люциферазную активность у мышей, которым вводили однократно замороженные и впоследствии размороженные NK-клетки (суспензии клеток № 1-3), в сравнении с плацебо (среда для замораживания без клеток) и в сравнении с восстановленными свежими CAR-NK-клетками.

ОПРЕДЕЛЕНИЯ

[64] *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.

[65] *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 указанному искомому значению, а также 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).

[66] *Биологический образец.* Термин «биологический образец» в контексте настоящей спецификации включает в себя клетки (как эукариотические, так и прокариотические), органы и ткани, состоящие из клеток, вирусы, все из которых могут быть естественными или генетически или иным образом модифицированными, и биологически активные молекулы, такие в качестве примера как макромолекулы, включая клетки, нуклеиновые кислоты, белки, гликопротеины, липиды, липопротеины, в качестве примера. Особое применение изобретение находит в криопротекции иммунных клеток человека и других млекопитающих.

[67] *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.

[68] *Контейнер.* Термин «контейнер» в контексте настоящего документа должен иметь обычное значение и включает в себя носители, держатели, корпуса и трубки для содержания, удержания, введения, доставки или транспортировки материалов, таких как криоконсервированные клетки и связанные с ними соединения. Таким образом, в одном варианте осуществления контейнер не реагирует с ДМСО. В другом варианте осуществления контейнер (например, асептический криофлакон), используемый в настоящем документе, не содержит ДЕНР и резистентный к ДМСО. Иллюстративные пригодные контейнеры включают себя криофлаконы, криомешки и т. п. Известны различные виды криофлаконов, в том числе, например, криофлаконы AT®, флаконы Nunc™, стеклянные флаконы и т. п.

[69] *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 °С/минуту до 50 °С/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, модель 5474 CryoMed™, Strex CytoSensei SB02-0920, модель 2101 Custom BioGenic Systems.

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

[71] *Криоконсервация.* В контексте настоящего документа термин «криоконсервация» или «замораживание» обычно относится к способу, при котором клетки замораживаются для сохранения их жизнеспособности. Криоконсервированные клетки сохраняют жизнеспособность в течение длительного периода времени в замороженном состоянии, например, в течение 1, 5, 10 или более лет в криоконсервированном состоянии. Криоконсервированные клетки после размораживания способны к размножению как *in vitro*, так и *in vivo*.

[72] *Иммунные клетки.* Термин «иммунные клетки» в контексте настоящего документа обозначает лимфоциты с хелперными, цитолитическими или регуляторными свойствами, такие как, например, Т-клетки, В-клетки, НК-клетки, макрофаги, нейтрофилы, эозинофилы, базофилы, CD4+ Т-клетки, CD8+ Т-клетки, CD4+CD8+ Т-клетки, CD4+CD8dim Т-клетки, CD4+ регуляторные Т-клетки, CD56+CD8+ и CD56-CD57+CD8+ NKT, CAR-Т-клетки, а также CD16+CD56+ НК-клетки. Однако термин «иммунные клетки» в контексте настоящего документа означает не только иммунные клетки, выращенные и размноженные *in vitro* в культуральной среде, но и популяции иммунных клеток, полученные от здорового донора крови, пациента или животного, а также соответственно очищенные иммунные клетки. В некоторых вариантах осуществления термин «иммунные клетки» может использоваться для определения Т-клеток, модифицированных путем экспрессии химерного антигенного рецептора (CAR). В некоторых вариантах осуществления термин «иммунные клетки» может использоваться для определения НК-клеток, модифицированных путем экспрессии CAR. В некоторых вариантах осуществления «иммунные клетки» представляют собой ГСК. В некоторых вариантах осуществления «иммунные клетки» представляют собой МСК. В некоторых вариантах осуществления «иммунные клетки» представляют собой иммунные клетки, полученные из пуповинной крови. В некоторых вариантах осуществления «иммунные клетки» представляют собой иммунные клетки, полученные из iPСК. В некоторых

вариантах осуществления «иммунные клетки» представляют собой регуляторные Т-клетки. В некоторых вариантах осуществления «иммунные клетки» представляют собой гамма-дельта Т-клетки. В некоторых вариантах осуществления НК-клетки содержат анти-CD19 химерный антигенный рецептор (CAR), IL-15 и iCaspase9. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления НК-клетки сконструированы (например, с использованием вирусной трансдукции или невирусного способа) для экспрессии суицидального гена, гена анти-CD19 CAR и гена IL-15. 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.

[73] В конкретном варианте осуществления иллюстративная CAR-NK-клетка включает в себя CD19-CAR, содержащий анти-CD19 связывающий домен, включающий в себя вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 1, или последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную ей, и/или вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 2, или последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную ей. В одном варианте осуществления генетически сконструированные НК-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.

[74] *Скрытая теплота или скрытая теплота плавления.* Термин «скрытая теплота плавления» или «скрытая теплота», используемый 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 продолжают до тех пор, пока вязкость незамороженной фракции не станет слишком высокой для дальнейшей кристаллизации.

[75] *Минимизировать воздействие скрытой теплоты плавления.* Термин «минимизировать воздействие скрытой теплоты плавления» или «минимизировать влияние скрытой теплоты плавления» относится к процессу, при котором происходит образование кристаллов льда или индуцируется образование центров кристаллизации льда

вне клеток в биологическом образце. В некоторых вариантах осуществления влияние скрытой теплоты плавления минимизируется за счет непрерывного плавного снижения температуры путем регулируемого охлаждения, что способствует постепенному образованию внеклеточного льда, в то время как внутриклеточная вода покидает клетку путем осмоса. В некоторых вариантах осуществления образование центров кристаллизации льда способствует постепенному увеличению объема внеклеточного льда и препятствует переохлаждению. В некоторых вариантах осуществления увеличение объема внеклеточного льда приводит к обезвоживанию клеток. В некоторых вариантах осуществления количество образовавшихся кристаллов льда зависит от исходного состава раствора. В некоторых вариантах осуществления криопротекторы замедляют внутриклеточное замораживание путем понижения температуры замерзания. В некоторых вариантах осуществления криопротекторы могут проникать в клетку, чтобы замедлить внутриклеточное замораживание.

[76] *Образование центров кристаллизации льда.* Термин «образование центров кристаллизации льда» относится к процессу, который протекает при образовании кристалла льда из раствора и термодинамически благоприятствует образованию большего количества кристаллов льда из воды, присутствующей в растворе. Образование центров кристаллизации льда представляет собой вероятностный процесс, происходящий на определенных участках поверхностей в системе. Образование центров кристаллизации льда может быть вызвано понижением температуры или концентрированием воды до условий, при которых жидкость или раствор становятся термодинамически значительно менее стабильными, чем кристалл. Образование центров кристаллизации льда может быть дополнительно вызвано введением уже существующих кристаллов льда при подходящей температуре. В некоторых вариантах осуществления образование центров кристаллизации льда может быть вызвано введением кристаллов льда в контейнер с помощью медной проволоки. В некоторых вариантах осуществления образование центров кристаллизации льда может быть вызвано понижением температуры.

[77] *Водяная баня с орбитальным шейкером.* Термин «водяная баня с орбитальным шейкером» в контексте настоящего документа относится к устройству водяной бани, которое стабильно производит вращательные или круговые движения с заданной скоростью в течение заранее определенного времени, включающее в себя подвижный поддон для размещения перемешиваемых объектов, например, клинических анализов в стаканах, колбах, пробирках и т. п.

[78] *Млекопитающее.* Термин «млекопитающее» в контексте настоящего документа относится к любому члену класса млекопитающих, включая в себя, без ограничения, людей и приматов, не относящихся к человеку, таких как шимпанзе, а также другие виды человекообразных обезьян и другие виды обезьян; сельскохозяйственных животных, таких как крупный рогатый скот, овцы, свиньи, козы и лошади; домашние млекопитающие, такие как собаки и кошки; лабораторные животные, включающие в себя грызунов, таких как мыши, крысы, морские свинки и т. п. Этот термин не указывает на

конкретный возраст или пол. Таким образом, взрослые и новорожденные субъекты, а также плоды, будь то мужского или женского пола, должны быть включены в объем данного термина.

[79] *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 $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$.

[80] *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 $-140\text{ }^{\circ}\text{C}$.

[81] *Остекловывание.* Термин «остекловывание» определяется как процесс быстрого замораживания образца, предпочтительно биологического образца. В некоторых вариантах осуществления остекловывание препятствует образованию льда. В некоторых вариантах осуществления процесс остекловывания требует присутствия криопротекторов. В некоторых вариантах осуществления процесс остекловывания требует присутствия средств для быстрого охлаждения температуры.

[82] 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».

[83] 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.

ОПИСАНИЕ

[84] Процесс криопротекции может оказаться смертельно опасным для выживания клеток. При медленном охлаждении сред вокруг клеток для сохранения клеток, например, иммунных клеток, замораживание клеток редко происходит при температуре замерзания

среды. Образцы могут переохлаждаться до температуры $-21\text{ }^{\circ}\text{C}$. Чрезмерная степень переохлаждения негативно сказывается на выживаемости некоторых биологических образцов, если после образования льда они продолжают охлаждаться в той же емкости.

[85] Не имея намерения быть связанным с теорией, можно предположить, что причина этого негативного эффекта (низкая выживаемость) заключается в следующем. При образовании льда скрытая теплота плавления приводит к повышению температуры образца до температуры, близкой к температуре плавления среды. Одновременно температура бани (или другой окружающей образец среды) продолжает снижаться с постоянной скоростью, поэтому чем больше степень переохлаждения, тем больше будет разница температур между охлаждающей емкостью и образцом сразу после образования льда. Это, в свою очередь, приведет к увеличению скорости охлаждения образца выше нормальной оптимальной скорости для выживания образца (особенно в случае иммунных клеток), пока не восстановится тепловое равновесие с окружающей средой.

[86] Основной проблемой для клеток при криоконсервации является не их способность выдерживать хранение при очень низких температурах (ниже $-120\text{ }^{\circ}\text{C}$), а летальность процессов охлаждения-замораживания и нагревания-размораживания. При охлаждении клеток приблизительно до $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$ как сами клетки, так и окружающая их среда остаются незамороженными и переохлажденными. В диапазоне от $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$ до приблизительно $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ во внешней среде образуется лед (спонтанно или в результате искусственного внесения кристаллов льда, т. е. посева, в раствор), однако содержимое клеток остается незамороженным и переохлажденным, предположительно потому, что плазматическая мембрана блокирует образование кристаллов льда в цитоплазме. Переохлажденная вода в клетках, по определению, имеет больший химический потенциал, чем вода в частично замороженном внеклеточном растворе; поэтому вода вытекает из клеток под действием осмотических сил и замерзает снаружи.

[87] Последующие физические явления в клетках зависят от скорости охлаждения. При слишком быстром охлаждении клеток внутриклеточная вода не успевает выводиться из клеток во внеклеточное пространство для поддержания равновесия; клетки становятся все более переохлажденными, что приводит к образованию внутриклеточного льда (ВКЛ), который убивает клетки. Однако при слишком медленном охлаждении клетки подвергаются сильному обезвоживанию с уменьшением объема и длительному воздействию высоких концентраций растворенных веществ (состоящего в основном из электролитов) до достижения эвтектической температуры (когда все компоненты раствора затвердевают). Как уменьшение размеров клеток, так и длительное воздействие высоких концентраций электролитов может привести к повреждению клеток (так называемое «осмотическое повреждение»). В результате клетки обезвоживаются и не подвергаются внутриклеточному замораживанию. Поэтому слишком высокая или слишком низкая скорость охлаждения может привести к повреждению клеток, хотя механизмы, лежащие в основе их повреждения, различны.

[88] Только в том случае, когда охлаждение осуществляется с оптимальной

скоростью, позволяющей клеткам терять воду достаточно быстро, чтобы концентрировать растворенные в клетке вещества в достаточной степени для исключения переохлаждения и в то же время предотвратить сильное обезвоживание клеток, функциональность клеток сохраняется. Оптимальная скорость охлаждения для сохранения функциональности клеток должна быть достаточно медленной, чтобы избежать образования ВКЛ, но достаточно быстрой, чтобы минимизировать сильное обезвоживание клеток.

[89] Кроме того, даже если клетка пережила процесс охлаждения-замораживания до низких температур, в процессе нагревания-размораживания она все равно подвергается серьезным испытаниям, связанным с летальной рекристаллизацией льда (ЛРЛ), т. е. увеличением мелких внутриклеточных кристаллов льда до вредоносных крупных кристаллов льда в процессе нагревания-размораживания. Оптимальная скорость или программа быстрого нагревания в сочетании со скоростью/программой охлаждения абсолютно необходимы для предотвращения ЛРЛ с целью обеспечения выживания клеток в процессе криоконсервации.

[90] Регулируемую скорость охлаждения и быстрое нагревание небольшого образца (< 5 мл) легко обеспечить в исследовательских лабораториях. Однако современное промышленное производство терапевтических клеток в промышленных масштабах сопряжено с крупной актуальной проблемой, а именно: как достичь и регулировать оптимальную скорость охлаждения и быстрого нагревания клеток для криоконсервации образца большого объема (> 25 мл), которая становится критическим техническим препятствием для криоконсервации и коммерциализации терапевтических клеточных продуктов в массовом производстве, их транспортировки, а также клинической практики.

[91] Раскрытые в настоящем документе способы включают в себя (1) комбинированные оптимальные условия и программы охлаждения (со специальной программой затравки образования центров кристаллизации льда для предотвращения переохлаждения) и быстрого нагревания для криоконсервации клеток млекопитающих, в том числе иммунных клеток (например, естественных иммунных клеток и разработанных CAR-T и CAR-NK клеток); (2) способы и программы достижения указанных выше оптимальных скоростей охлаждения для образцов в больших флаконах (например, клеточных суспензий большого объема в контейнерах вместимостью 10 мл или более) с использованием морозильной камеры с регулируемым содержанием жидкого азота; и (3) способы и программы для достижения вышеуказанных оптимальных скоростей быстрого нагревания образцов в больших флаконах (например, клеточных суспензий большого объема в закрытых АТ-флаконах вместимостью 50 мл) с использованием водяной бани с орбитальным шейкером при температуре выше 50 °С для клеточных суспензий объемом заполнения от 8 до 45 мл во флаконах и концентрацией в 6-120 миллионов клеток на мл. В некоторых вариантах осуществления концентрация клеток составляет от около 6 до 25 миллионов клеток на мл.

Способы криоконсервации

[92] 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.

[93] 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.

[94] Описанные в настоящем документе способы криоконсервации осуществляются на клеточных суспензиях иммунных клеток млекопитающих. В некоторых вариантах осуществления последовательность поэтапного криогенного замораживания может быть масштабирована до 30 флаконов или более, каждый из которых имеет объем клеточного образца 10-40 мл или более. В некоторых вариантах осуществления последовательность замораживания можно масштабировать до 30 флаконов, 50 флаконов или 75 флаконов. В некоторых вариантах осуществления современные способы криоконсервации проводятся для суспензий иммунных клеток млекопитающих в криофлаконах, криомешках, флаконах AT® или флаконах Nunc™, или стеклянных флаконах. 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 не реагируют с 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 содержат ДЕНР и резистентны к ДМСО.

[95] 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 ДЕНР 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 помощью адаптера флакона.

[96] 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™.

[97] В некоторых вариантах осуществления описанные в настоящем документе способы замораживания/размораживания позволяют последовательно замораживать и размораживать содержащий клетки образец в больших масштабах, например, объемом 10 мл и более. В некоторых вариантах осуществления описанные в настоящем документе способы замораживания/размораживания могут быть использованы для образца объемом 10 мл и более. В некоторых вариантах осуществления описанные в настоящем документе способы замораживания/размораживания могут быть использованы для образца диаметром более 225 мм/дюйм. В некоторых вариантах осуществления описанные в настоящем документе способы замораживания/размораживания могут быть использованы для образца с высотой раствора более 225 мм/дюйм. В некоторых вариантах осуществления описанные в настоящем документе способы замораживания/размораживания могут быть использованы для образца с толщиной раствора более 225 мм/дюйм.

[98] 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.

[99] 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.

[100] 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.

[101] 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

некоторых вариантах осуществления ширина криофлаконов составляет 13,7 см.

[104] В некоторых вариантах осуществления длина криофлаконов составляет 14,1 см. В некоторых вариантах осуществления длина криофлаконов составляет 14,3 см. В некоторых вариантах осуществления длина криофлаконов составляет 14,5 см. В некоторых вариантах осуществления длина криофлаконов составляет 14,7 см. В некоторых вариантах осуществления длина криофлаконов составляет 14,9 см. В некоторых вариантах осуществления длина криофлаконов составляет 15,1 см. В некоторых вариантах осуществления длина криофлаконов составляет 15,3 см. В некоторых вариантах осуществления длина криофлаконов составляет 15,5 см. В некоторых вариантах осуществления длина криофлаконов составляет 15,7 см. В некоторых вариантах осуществления длина криофлаконов составляет 15,9 см. В некоторых вариантах осуществления длина криофлаконов составляет 16,1 см. В некоторых вариантах осуществления длина криофлаконов составляет 16,3 см. В некоторых вариантах осуществления длина криофлаконов составляет 16,5 см. В некоторых вариантах осуществления длина криофлаконов составляет 16,7 см.

[105] 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.

[106] 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

криоконсервированы при концентрации 40 моль/мл. В некоторых вариантах осуществления иммунные клетки могут быть криоконсервированы при концентрации 45 моль/мл. В некоторых вариантах осуществления иммунные клетки могут быть криоконсервированы при концентрации 50 моль/мл. В некоторых вариантах осуществления иммунные клетки могут быть криоконсервированы при концентрации 55 моль/мл. В некоторых вариантах осуществления иммунные клетки могут быть криоконсервированы при концентрации 60 моль/мл. В некоторых вариантах осуществления иммунные клетки могут быть криоконсервированы при концентрации 65 моль/мл. В некоторых вариантах осуществления иммунные клетки могут быть криоконсервированы при концентрации 70 моль/мл. В некоторых вариантах осуществления иммунные клетки могут быть криоконсервированы при концентрации 75 моль/мл. В некоторых вариантах осуществления иммунные клетки могут быть криоконсервированы при концентрации 80 моль/мл. В некоторых вариантах осуществления иммунные клетки могут быть криоконсервированы при концентрации 85 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.

[108] В некоторых вариантах осуществления CAR-NK-клетки представлены в количестве от около 1×10^6 до 1×10^7 клеток в объеме около 36 мл в криофлаконе вместимостью 50 мл. В некоторых вариантах осуществления CAR-NK-клетки представлены в количестве от около 200×10^6 до 800×10^6 клеток в криофлаконе вместимостью 50 мл. В некоторых вариантах осуществления CAR-NK-клетки суспендируются 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 введения. В некоторых вариантах осуществления размороженные клетки объемом около 33 мл вводят нуждающемуся в них пациенту с помощью адаптера для флакона, необходимого для асептического введения. В некоторых вариантах осуществления размороженные клетки

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

[109] 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.

[110] В некоторых вариантах осуществления иммунные клетки млекопитающих криоконсервируют в среде, содержащей один или несколько криопротекторов. 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.

[111] В некоторых вариантах осуществления криоконсервация иммунных клеток млекопитающих предусматривает до 9 последовательных этапов криогенного замораживания. В некоторых вариантах осуществления поэтапное замораживание снижает скрытую теплоту плавления замораживаемого биологического образца. В некоторых вариантах осуществления клетки охлаждаются в фазу понижения температуры с выбранной скоростью снижения температуры. В некоторых вариантах осуществления скорость снижения температуры в фазу понижения температуры составляет около 10 °C в минуту. В некоторых вариантах осуществления используются другие скорости изменения, такие как около 1 °C в минуту, около 2 °C в минуту, около 5 °C в минуту, около 7 °C в минуту, около 12 °C в минуту, около 15 °C в минуту, около 17 °C в минуту, около 20 °C в минуту, около 25 °C в минуту, или скорости в пределах указанных выше значений. В некоторых вариантах осуществления фаза понижения температуры может включать в себя этап сверхбыстрого замораживания (например, максимального снижения температуры). Например, этап сверхбыстрого замораживания может включать в себя сверхбыструю скорость изменения температуры, при которой скорость уменьшения температуры увеличивается, причем эта скорость выбирается таким образом, чтобы выгодно повысить сохранность клеток или их жизнеспособность. В некоторых вариантах осуществления вопреки общепринятому мнению этап сверхбыстрого замораживания не используется. В некоторых вариантах осуществления заявители обнаружили, что максимальные скорости снижения температуры являются столь же вредными, как и некоторые более медленные скорости снижения, в то время как некоторые промежуточные скорости неожиданно

обеспечивают более высокое качество криоконсервации и/или жизнеспособность клеток. В некоторых вариантах осуществления фаза понижения температуры может включать в себя охлаждение адгезированных к субстрату клеток со скоростью приблизительно $10\text{ }^{\circ}\text{C}$ за 10 секунд, $10\text{ }^{\circ}\text{C}$ за 20 секунд, $10\text{ }^{\circ}\text{C}$ за 30 секунд, $10\text{ }^{\circ}\text{C}$ за 40 секунд, $10\text{ }^{\circ}\text{C}$ за 50 секунд, $10\text{ }^{\circ}\text{C}$ за 60 секунд, $10\text{ }^{\circ}\text{C}$ за 70 секунд, $10\text{ }^{\circ}\text{C}$ за 80 секунд, $10\text{ }^{\circ}\text{C}$ за 90 секунд, $10\text{ }^{\circ}\text{C}$ за 100 секунд, $10\text{ }^{\circ}\text{C}$ за 110 секунд, $10\text{ }^{\circ}\text{C}$ за 120 секунд, $10\text{ }^{\circ}\text{C}$ за 130 секунд, $10\text{ }^{\circ}\text{C}$ за 140 секунд, $10\text{ }^{\circ}\text{C}$ за 150 секунд, $10\text{ }^{\circ}\text{C}$ за 160 секунд, $10\text{ }^{\circ}\text{C}$ за 170 секунд, $10\text{ }^{\circ}\text{C}$ за 180 секунд, $10\text{ }^{\circ}\text{C}$ за 190 секунд или $10\text{ }^{\circ}\text{C}$ за 200 секунд. В некоторых вариантах осуществления температура поддерживается на заранее определенном уровне в течение заранее определенного времени. Скорость охлаждения в фазу понижения температуры задается с целью повышения жизнеспособности клеток. Например, определенные скорости охлаждения в фазу понижения температуры улучшают функциональность клеток после криоконсервации. В некоторых вариантах осуществления скорость охлаждения в фазу понижения температуры задается для улучшения сохранности или стабильности клеток. В некоторых вариантах осуществления криоконсервированные клетки в значительной степени сохраняют терапевтический эффект после криоконсервации. Например, клетки пригодны для непосредственной имплантации в целевой участок пациента после размораживания криоконсервированных клеток с достижением терапевтической эффективности, примерно эквивалентной (или лучшей) таковой клеток, не подвергавшихся криоконсервации.

[112] В некоторых вариантах осуществления способы криоконсервирования включают в себя один или несколько этапов выдерживания, которые длятся от около 1 минуты до около 10 минут. В некоторых вариантах осуществления этап выдерживания составляет около 1 минуты. В некоторых вариантах осуществления этап выдерживания составляет около 3 минут. В некоторых вариантах осуществления этап выдерживания составляет около 5 минут. В некоторых вариантах осуществления этап выдерживания составляет около 10 минут. Этапы выдерживания могут осуществляться при различных температурах. Например, в некоторых вариантах осуществления этап выдерживания происходит при температуре около $-2,0\text{ }^{\circ}\text{C}$. В некоторых вариантах осуществления этап выдерживания происходит при температуре около $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$. В некоторых вариантах осуществления этап выдерживания происходит при температуре около $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$. В некоторых вариантах осуществления этап выдерживания происходит при температуре около $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$. В некоторых вариантах осуществления раскрытые в настоящем документе способы криоконсервирования включают в себя один, два, три, четыре, пять или более этапов выдерживания. В некоторых вариантах осуществления способ включает в себя один этап выдерживания. В некоторых вариантах осуществления способ включает в себя два этапа выдерживания. В некоторых вариантах осуществления способ включает в себя три этапа выдерживания. В некоторых вариантах осуществления способ включает в себя четыре этапа выдерживания. В некоторых вариантах осуществления способ включает в себя пять этапов выдерживания. В некоторых вариантах осуществления способ включает

в себя более пяти этапов выдерживания.

[113] В некоторых вариантах осуществления общее время процесса криопротекции составляет менее 120 минут. В некоторых вариантах осуществления общее время процесса криопротекции составляет менее 100 минут. В некоторых вариантах осуществления общее время процесса криопротекции составляет менее 90 минут. В некоторых вариантах осуществления общее время процесса криопротекции составляет менее 60 минут.

[114] В некоторых вариантах осуществления конечная температура составляет около $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. В некоторых вариантах осуществления конечная температура составляет менее $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. В некоторых вариантах осуществления конечная температура составляет около $-90\text{ }^{\circ}\text{C}$. В некоторых вариантах осуществления конечная температура составляет около $-96\text{ }^{\circ}\text{C}$. В некоторых вариантах осуществления конечная температура составляет около $-120\text{ }^{\circ}\text{C}$. В некоторых вариантах осуществления конечная температура составляет около $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$.

[115] В некоторых вариантах осуществления способ замораживания, раскрываемый в настоящем документе, включает в себя ряд этапов, приводящих к регулируемому изменению температуры. В некоторых вариантах осуществления способ может включать в себя ряд этапов, заключающихся в снижении температуры. В некоторых вариантах осуществления способ включает в себя ряд этапов, заключающихся в повышении температуры.

[116] В некоторых вариантах осуществления представлен способ изменения температуры образца, содержащего клетки, от первой температуры до конечной температуры ниже или равной $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, тем самым обеспечивая криоконсервацию образца при конечной температуре, причем способ включает в себя следующие этапы: (a) помещение образца при первой температуре выше температуры замораживания 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 ниже или равна $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

[117] В некоторых вариантах осуществления первая температура составляет от около $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ до $0\text{ }^{\circ}\text{C}$.

[118] В некоторых вариантах осуществления первая регулируемая скорость составляет от около $0,75\text{ }^{\circ}\text{C}$ до $1,25\text{ }^{\circ}\text{C}$ в минуту.

[119] В некоторых вариантах осуществления вторая температура составляет около -2°C .

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

[121] В некоторых вариантах осуществления третья температура составляет около -60°C .

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

[123] В некоторых вариантах осуществления четвертая температура составляет около -25°C .

[124] В некоторых вариантах осуществления четвертая регулируемая скорость составляет от $0,5^{\circ}\text{C}$ до $1,25^{\circ}\text{C}$ в минуту.

[125] В некоторых вариантах осуществления пятая температура составляет около -40°C .

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

[127] В некоторых вариантах осуществления конечная температура меньше или равна -80°C .

[128] В некоторых аспектах предлагается способ криоконсервации сконструированных иммунных клеток, пригодных для клеточной терапии, включающий в себя поэтапное замораживание популяции сконструированных иммунных клеток с регулируемой скоростью для минимизации скрытой теплоты плавления, при этом поэтапное замораживание включает в себя охлаждение клеток со скоростью от $0,5^{\circ}\text{C}$ в минуту до 30°C в минуту до конечной температуры -80°C или ниже, тем самым обеспечивая криоконсервацию клеток.

[129] В некоторых аспектах способ размораживания криоконсервированных сконструированных иммунных клеток включает в себя нагревание контейнера, содержащего криоконсервированные сконструированные иммунные клетки до температуры от 37°C до 70°C ; 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.

[130] В некоторых аспектах предлагается способ, включающий в себя криоконсервацию сконструированных иммунных клеток, подходящих для клеточной терапии, с использованием сред для криоконсервации, описанных в настоящем документе, при этом способ включает в себя поэтапное замораживание популяции сконструированных иммунных клеток с регулируемой скоростью для минимизации скрытой теплоты плавления, причем поэтапное замораживание включает в себя охлаждение клеток со скоростью от $0,5^{\circ}\text{C}$ в минуту до 30°C в минуту до конечной температуры -80 или ниже, тем самым обеспечивая криоконсервацию клеток.

[131] В некоторых аспектах предлагается способ размораживания

криоконсервированных сконструированных иммунных клеток, включающий в себя нагревание контейнера, содержащего криоконсервированные сконструированные иммунные 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.

[132] 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.

[133] 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.

[134] В конкретном варианте осуществления криоконсервированные клетки представляют собой CAR-NK-клетки, включающие в себя NK-клетки из пуповинной крови, сконструированные для экспрессии CD-19 CAR, IL-15 и iCaspase9, которые были подвергнуты криоконсервации с использованием описанных в настоящем документе способов и затем разморожены в водяной бане с орбитальным шейкером в течение около 10 минут при температуре 60 °С и скорости вращения около 125 об./мин. После размораживания клетки могут быть введены нуждающемуся в них субъекту.

[135] 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.

[136] В некоторых вариантах осуществления размороженные клетки могут быть введены нуждающемуся в них субъекту в течение периода, на протяжении которого размороженные клетки являются стабильными. Например, в некоторых вариантах осуществления размороженные клетки вводят нуждающемуся в них пациенту в течение от около 30 минут до 5 часов после размораживания. В некоторых вариантах осуществления размороженные клетки вводят нуждающемуся в них пациенту в течение от около 30 минут до 2 часов после размораживания. В некоторых вариантах осуществления размороженные клетки вводят нуждающемуся в них пациенту немедленно после размораживания.

[137] В некоторых вариантах осуществления иммунные клетки млекопитающих могут быть заморожены в течение приблизительно 1-5 часов, 5-12 часов, 12-24 часов, 24-48 часов, от 48 часов до одной недели, от одной недели до двух недель, от двух недель до трех недель, от трех недель до четырех недель или более длительного времени, а также в течение перекрывающихся интервалов. В некоторых вариантах осуществления клетки криоконсервируются и хранятся более одного месяца, более одного года, более 5 лет, более 10 лет или более длительное время.

[138] В некоторых вариантах осуществления иммунные клетки могут быть свежeweделенными. В некоторых вариантах осуществления иммунные клетки являются по меньшей мере один раз замораживаются и размораживаются.

[139] В некоторых вариантах осуществления криоконсервированные клетки размораживаются для использования (например, имплантации) путем переноса криофлакона, содержащего криоконсервированные клетки, в водяную баню с температурой, близкой к температуре тела, например, с температурой около 37 °C или любой другой подходящей температурой. В других вариантах осуществления используется «ступенчатый» процесс размораживания с поэтапным повышением скорости нагревания. Например, в некоторых вариантах осуществления криофлакон может быть последовательно помещен в различные условия хранения с повышающейся температурой, а затем перенесен в температурные условия, близкие к температуре тела, например, в водяную баню с температурой 50 °C или выше, или в любую другую подходящую температурную среду, как описано в настоящем документе.

[140] В некоторых вариантах осуществления клетки размораживают у постели пациента, что позволяет немедленно использовать свежеразмороженные клетки. В некоторых вариантах осуществления после размораживания иммунные клетки могут быть перенесены в культуральную чашку и культивированы в соответствующих условиях в течение приблизительно 30 минут, одного часа, 6 часов, 12 часов, 24 часов, 48 часов, 72 часов, 86 часов, 110 часов, одной недели, двух недель или более трех недель до

транспортировки в желаемое место (например, в операционную для введения пациенту). В качестве альтернативы, в некоторых вариантах осуществления размороженный субстрат, засеянный клетками, непосредственно вводится пациенту.

Способы размораживания

[141] Современные способы размораживания криоконсервированных клеток осуществляются на клеточных суспензиях иммунных клеток млекопитающих. 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. Как было описано выше, медленное размораживание, как правило, приводит к физическим повреждениям клеток из-за образования кристаллов льда. Современные методы размораживания включают в себе размораживание иммунных клеток в водяной бане с орбитальным шейкером или в аналогичном устройстве. В некоторых вариантах осуществления размораживание может быть выполнено с помощью устройства сухого размораживания, которое может равномерно распределять тепло по криоконсервированным образцам для их размораживания. В некоторых вариантах осуществления размораживание выполняется путем регулирования температуры водяной бани до 40 °С. В некоторых вариантах осуществления размораживание выполняется путем регулирования температуры водяной бани до 45 °С. В некоторых вариантах осуществления размораживание выполняется путем регулирования температуры водяной бани до 50 °С. В некоторых вариантах осуществления размораживание выполняется путем регулирования температуры водяной бани до 55 °С. В некоторых вариантах осуществления размораживание выполняется путем регулирования температуры водяной бани до 60 °С. В некоторых вариантах осуществления размораживание выполняется путем регулирования температуры водяной бани до 65 °С.

[142] В некоторых вариантах осуществления размораживание выполняется путем регулирования скорости вращения водяной бани с орбитальным шейкером в диапазоне от 100 об./мин до 250 об./мин. В некоторых вариантах осуществления размораживание выполняется путем регулирования скорости вращения водяной бани с орбитальным шейкером до 120 об./мин. В некоторых вариантах осуществления размораживание выполняется путем регулирования скорости вращения водяной бани с орбитальным шейкером до 125 об./мин. В некоторых вариантах осуществления размораживание выполняется путем регулирования скорости вращения водяной бани с орбитальным шейкером до 130 об./мин. В некоторых вариантах осуществления размораживание выполняется путем регулирования скорости вращения водяной бани с орбитальным шейкером до 135 об./мин. В некоторых вариантах осуществления размораживание выполняется путем регулирования скорости вращения водяной бани с орбитальным шейкером до 140 об./мин. В некоторых вариантах осуществления размораживание выполняется путем регулирования скорости вращения водяной бани с орбитальным

шейкером в течение около 14 минут. В некоторых вариантах осуществления размораживание выполняется путем инкубации суспензии криоконсервированных клеток в водяной бане с орбитальным шейкером в течение около 15 минут.

[147] 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.

[148] . 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.

Измерение эффективности замораживания-размораживания клеток

[149] В некоторых вариантах осуществления эффективность замораживания-размораживания определяется путем измерения жизнеспособности клеток, например, путем окрашивания погибших клеток, чтобы отличить их от живых. В некоторых вариантах осуществления эффективность замораживания-размораживания определяется путем измерения метаболической активности, содержания АТФ или пролиферации клеток. Для оценки жизнеспособности клеток может быть использована любая подходящая методика измерения жизнеспособности клеток. В некоторых вариантах осуществления

замораживание-размораживание является эффективным, если жизнеспособность клеток составляет более 50%. В некоторых вариантах осуществления замораживание-размораживание является эффективным, если жизнеспособность клеток составляет более 60%. В некоторых вариантах осуществления замораживание-размораживание является эффективным, если жизнеспособность клеток составляет более 70%. В некоторых вариантах осуществления замораживание-размораживание является эффективным, если жизнеспособность клеток составляет более 80%. В некоторых вариантах осуществления замораживание-размораживание является эффективным, если жизнеспособность клеток составляет более 90%.

[150] В некоторых вариантах осуществления эффективность замораживания-размораживания определяется путем измерения процента уничтожения мишени при заданном соотношении эффекторов и мишеней (Е:Т). Соотношение Е:Т представляет собой отношение заданного количества полученных Т-клеток (эффекторных клеток) к количеству клеток-мишеней. В некоторых вариантах осуществления замораживание-размораживание является эффективным, если процент гибели мишени достигается при определенном соотношении Е:Т по сравнению с соотношением Е:Т свежеевыделенного образца клеток.

Способы применения криоконсервации

[151] В некоторых вариантах осуществления процедура криоконсервации используется в связи с транспортировкой терапевтических клеток к месту использования. В некоторых вариантах осуществления для предотвращения растрескивания криоконсервированные клетки транспортируются в сухих транспортных средствах с жидким азотом, например, при температуре от -140°C до -196°C . Соответственно, в некоторых вариантах осуществления криоконсервированные клетки транспортируются в транспортном контейнере с криогенными условиями. В некоторых вариантах осуществления остеклованные клетки поставляются в стерильном контейнере и/или в стерильной среде. В некоторых вариантах осуществления остеклованные клетки транспортируются в пункты назначения, например, в больницы или банки клеток, в больших объемах. В некоторых вариантах осуществления описанные в настоящем документе методики криоконсервации применимы для хранения в паровой фазе в течение 96 часов в «транспортных условиях» и не оказывают неблагоприятного влияния на жизнеспособность клеток после их нагревания. В некоторых вариантах осуществления криоконсервированные клетки размораживают у постели пациента.

Среды для криоконсервации

[152] В настоящем документе представлены различные среды для криоконсервации, пригодные для криоконсервации клеток. В некоторых вариантах осуществления среды для криоконсервации, представленные в настоящем документе, подходят для криоконсервации иммунных клеток. Известны различные иммунные клетки, например, НК-клетки; Т-клетки, включающие в себя альфа-бета Т-клетки, гамма-дельта Т-клетки и регуляторные Т-клетки; В-клетки; ГСК; МСК. В одном варианте

осуществления иммунные клетки представляют собой NK-клетки, полученные из пуповинной крови, NK-клетки, полученные из iPСК, и T-клетки, полученные из iPСК. В одном варианте осуществления клетки представляют собой NK-клетки, в частности, аллогенные NK-клетки, экспрессирующие CAR (т. е. CAR-NK-клетки).

[153] В некоторых аспектах подходящая среда для криоконсервации и последующего размораживания жизнеспособных клеток включает в себя: криопротектор, альбумин и непирогенный и изотонический кристаллоидный раствор. В некоторых аспектах подходящая среда для криоконсервации и последующего размораживания жизнеспособных клеток содержит: криопротектор, дисахарид, альбумин и непирогенный и изотонический кристаллоидный раствор.

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

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

[156] 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. В некоторых других вариантах осуществления дисахарид представляет собой трегалозу.

[157] 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.

[158] В среде для криоконсервации могут быть использованы сахариды или 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.

[159] 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.

[160] 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.

[161] 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.

[162] 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.

[163] 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.

[164] 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 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. 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.

[165] 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.

[166] 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.

[167] 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.

[168] 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. В некоторых вариантах осуществления CS10 содержит диметилсульфоксид (ДМСО).

[169] 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.

[170] 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.

[171] 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.

[172] 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.

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

[174] В некоторых аспектах среда для криоконсервации подходит для криоконсервирования естественных клеток-киллеров (NK-клетки). В некоторых вариантах осуществления NK-клетки происходят из первичных клеточных изолятов. В некоторых вариантах осуществления NK-клетки представляют собой 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, например, NK-клетки представляли собой предварительно замороженные и размороженные NK-клетки, полученные из пуповинной крови. В некоторых вариантах осуществления NK-клетки содержат химерный антигенный рецептор (CAR), такой как, например, CD19 CAR. В некоторых вариантах осуществления среда для криоконсервации содержит NK-клетки в концентрации от 6 моль/мл до 120 моль/мл.

[175] В некоторых вариантах осуществления препарат CAR-NK-клеточной терапии подвергают криоконсервации с использованием описанных в настоящем документе составов. 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.

[176] В некоторых вариантах осуществления препарат CAR-NK-клеточной терапии содержит анти-CD19 связывающий домен, включающий в себя переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 1, и/или переменную область тяжелой цепи, 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.

[177] В одном варианте осуществления препарат CAR-NK-клеточной терапии включает 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.

[178] Соответственно, в некоторых вариантах осуществления среда для криоконсервации содержит NK-клетки в концентрации около 1 моль/мл, 5 моль/мл, 10 моль/мл, 15 моль/мл, 20 моль/мл, 25 моль/мл, 30 моль/мл, 35 моль/мл, 40 моль/мл, 45 моль/мл, 50 моль/мл, 55 моль/мл, 60 моль/мл, 65 моль/мл, 70 моль/мл, 75 моль/мл, 80 моль/мл, 85 моль/мл, 90 моль/мл, 95 моль/мл, 100 моль/мл, 105 моль/мл, 110 моль/мл, 115 моль/мл, 120 моль/мл, 130 моль/мл, 140 моль/мл, 150 моль/мл, 160 моль/мл, 170 моль/мл, 180 моль/мл, 190 моль/мл, 200 моль/мл.

[179] 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.

[180] 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).

[181] В некоторых вариантах осуществления NK-клетки включают в себя продукт

CAR-NK-клеточной терапии, содержащий популяцию клеток в количестве от около 100×10^6 до около 900×10^6 клеток, составленных в средах для криоконсервации, описанных в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления NK-клетки включают в себя продукт CAR-NK-клеточной терапии, содержащий популяцию клеток в количестве от около 200×10^6 до около 800×10^6 клеток, составленных в средах для криоконсервации, описанных 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, CD19 CAR и IL-15. В конкретном варианте осуществления продукт CAR-NK-клеточной терапии представляет собой продукт аллогенной клеточной терапии, содержащий NK-клетки, полученные из пуповинной крови человека, трансдуцированные ретровирусным вектором, экспрессирующим iCaspase9, CD19 CAR и IL-15, причем трансдуцированные клетки составлены в концентрации от 6 млн до 120 млн клеток/мл в 36 мл сред для криоконсервации, содержащих ДМСО, трегалозу, HSA и PLASMA-LYTE A. В другом варианте осуществления продукт CAR-NK клеточной терапии представляет собой продукт аллогенной клеточной терапии, содержащий NK-клетки, полученные из пуповинной крови человека, трансдуцированные ретровирусным вектором, экспрессирующим iCaspase9, CD19 CAR и IL-15, причем трансдуцированные клетки составлены в концентрации 800×10^6 клеток в 36 мл сред для криоконсервации, содержащих ДМСО, трегалозу, HSA и PLASMA-LYTE A. В некоторых вариантах осуществления трансдуцированные клетки после их суспендирования в среде для криоконсервации замораживают описанным в настоящем документе способом. Замороженные клетки могут быть доставлены или транспортированы в транспортном контейнере с криогенными условиями (например, при температуре от -140 °C до -196 °C) в пункт оказания медицинской помощи и введены нуждающемуся в них субъекту (например, пациенту со злокачественным новообразованием) после размораживания клеток описанным в настоящем документе способом.

Использование криоконсервированных клеток

[182] Описанные в настоящем документе способы и композиции, в том числе композиции CAR-NK-клеток, пригодны для адоптивной клеточной терапии. Адоптивная клеточная терапия может применяться для лечения различных заболеваний, в том числе, например, рака. В определенных вариантах осуществления композиции замороженных и впоследствии размороженных CAR-NK-клеток, содержащиеся в среде для криоконсервации, описанной в настоящем документе, применимы для лечения злокачественного новообразования 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).

[183] В некоторых вариантах осуществления описанные в настоящем документе способы применимы для адоптивной клеточной терапии. Соответственно, в некоторых вариантах осуществления клетки, описанные в настоящем документе, подвергаются криоконсервации и размораживанию в соответствии с приведенными в настоящем документе описаниями. В некоторых вариантах осуществления клетки представляют собой НК-клетки, как описано в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления НК-клетки суспендируют в средах для криоконсервации, как описано в настоящем документе.

[184] 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.

[185] 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.

[186] 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 пациенту для лечения В-клеточных

злокачественных новообразований.

[187] В некоторых вариантах осуществления препарат замороженных CAR-NK-клеток замораживают и транспортируют, как описано в настоящем документе, нуждающемуся в нем пациенту. Например, в некоторых вариантах осуществления способ транспортировки препарата клеточной терапии включает в себя: (а) приведение CAR-NK-клеток в контакт со средой для криоконсервации, как описано в настоящем документе; (b) охлаждение CAR-NK-клеток до температуры $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, тем самым обеспечивая криоконсервацию клеток млекопитающих; и (с) транспортировку криоконсервированных клеток млекопитающих в другое место при температуре от около $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ до около $-190\text{ }^{\circ}\text{C}$ или ниже. В некоторых вариантах осуществления клетки хранятся и транспортируются при температуре около $-190\text{ }^{\circ}\text{C}$ или ниже, а в конкретном варианте осуществления - при температуре около $-140\text{ }^{\circ}\text{C}$ или ниже. В некоторых вариантах осуществления транспортированные клетки могут храниться в транспортном контейнере с криогенными условиями до момента введения их пациенту.

[188] В конкретных вариантах осуществления клетки, используемые для адоптивной клеточной терапии, криоконсервированы во флаконе (например, АТ-флаконе вместимостью 50 мл) при концентрации 200-800 миллионов клеток в средах для криоконсервации объемом 36 мл. В различных вариантах осуществления флакон может быть промаркирован после замораживания клеток и доставлен с маркировкой на транспортном контейнере с криогенными условиями в пункт оказания медицинской помощи. В некоторых вариантах осуществления флакон может быть промаркирован до замораживания клеток.

[189] В некоторых вариантах осуществления препарат клеточной терапии представляет собой CD19 CAR NK-клетки, дополнительно содержащие 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.

[190] 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 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 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 100×10^7 клеток в контейнере вместимостью 50 мл.

[191] 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 NK-клетка, T-клетка или B-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 iCaspas9. 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 объем содержащегося препарата клеточной

терапии составляет 100×10^6 CAR-NK+ клеток в контейнере вместимостью 50 мл. В некоторых вариантах осуществления объем содержащегося препарата клеточной терапии составляет 200×10^6 CAR-NK+ клеток в контейнере вместимостью 50 мл. В некоторых вариантах осуществления объем содержащегося препарата клеточной терапии составляет 300×10^6 CAR-NK+ клеток в контейнере вместимостью 50 мл. В некоторых вариантах осуществления объем содержащегося препарата клеточной терапии составляет 400×10^6 CAR-NK+ клеток в контейнере вместимостью 50 мл. В некоторых вариантах осуществления объем содержащегося препарата клеточной терапии составляет 500×10^6 CAR-NK+ клеток в контейнере вместимостью 50 мл. В некоторых вариантах осуществления объем содержащегося препарата клеточной терапии составляет 600×10^6 CAR-NK+ клеток в контейнере вместимостью 50 мл. В некоторых вариантах осуществления объем содержащегося препарата клеточной терапии составляет 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. В некоторых вариантах осуществления объем содержащегося препарата клеточной терапии составляет 100×10^7 CAR-NK+ клеток в контейнере вместимостью 50 мл.

[192] 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. 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 инфузии субъекту составляет около 2-3 минут.

[193] 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.

[194] 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.

[195] Жизнеспособность размороженных клеток может быть оценена *in vitro*, а также *in vivo* с помощью различных способов, известных в данной области техники. В некоторых вариантах осуществления тесты на жизнеспособность клеток *in vitro* включают в себя 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, экспрессия генов с помощью RT-qPCR 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.

[196] Жизнеспособность клеток *in vivo*, в целом, может быть оценена путем определения функциональных характеристик введенных клеток *in vivo*. В некоторых вариантах осуществления жизнеспособность клеток *in vivo* может быть оценена путем определения количества клеток, введенных нуждающемуся в них субъекту. В данной области техники известны различные способы отслеживания клеток и определения жизнеспособности введенных клеток.

[197] 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:

DIQMTQTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQQKPDGTVKLLIYHTSRLH
SGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGTKLELKR (SEQ ID
NO: 1)

Anti-CD19 Вариабельный фрагмент тяжелой цепи, VH:

EVQLQQSGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKGLEWLGVVWGS
ETTYYN SALKSRLTIKDNSKSKVFLKMNSLQTD DTAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQ
GTTVTVSSYVTVSSQDPA (SEQ ID NO: 2)

CD28:

FWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFPIFWVRSKRSRLHSDYMNMTPRRPGPTRKHY
QPYAPPRDFAAYRS (SEQ ID NO: 3)

CD3ζ:

RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPGEMGGKPRRK
NPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQA
LPPRGP (SEQ ID NO: 4)

ПРИМЕРЫ

[198] 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.

[199] NK-клетки, использованные в приведенных примерах, содержали анти-CD19 CAR, IL-15 и iCaspase9. Однако следует отметить, что в этих способах могут быть использованы и NK-клетки, содержащие другие трансгены.

[200] CAR-NK-клетки, использованные в настоящих примерах, представляли собой NK-клетки, полученные из единицы пуповинной крови, которые были трансдуцированы генами, кодирующими нацеленный на опухоль CD19-CAR (iC9/CAR.19/IL15, как указано в Leukemia 32 (2018)520-531, включенном в настоящий документ в полном объеме посредством ссылки), например, клетки NK-CAR, трансдуцированные молекулой нуклеиновой кислоты, кодирующей анти-CD-19 связывающий домен легкой цепи, переменный участок которого содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 1, и/или кодирующей анти-CD19 связывающий домен тяжелой цепи, переменный участок которого содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 2.

Пример 1. Масштабирование процесса криоконсервации клеток млекопитающих в контейнере вместимостью 50 мл.

[201] В данном примере показан профиль замораживания клеток млекопитающих при последовательности замораживания 120 мин.

[202] Сначала в АТ-флакон вместимостью 50 мл заливали 45 мл среды для криоконсервации без клеток (контроль), состоящей из 50% RPMI, 5% ДМСО, 20% из 25% сывороточного альбумина человека, 10% декстрана в NaCl. Температура флакона была уменьшена до 4°C в оборудовании для регулируемого замораживания CryoMed 5474. Количество тепла, выделяемого содержимым АТ-флакона, определялось путем измерения температуры раствора. Для начала процесса криоконсервации температура была снижена до -4°C со скоростью 1°C в минуту. Далее температуру быстро снижали до -45°C со скоростью 20°C в минуту. Далее температуру быстро повышали до -10°C со скоростью 10°C в минуту. Далее температуру быстро снижали до -20°C со скоростью 0,5°C в минуту.

В завершение температуру медленно снижали до $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, понижая температуру со скоростью 1°C в минуту.

[203] Было замечено, что при последовательном замораживании количество тепла, выделяемого содержимым раствора, оставалось на уровне $-1\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение более 35 мин, что свидетельствует о высокой вероятности плавления льда и медленном его образовании. Кроме того, температура содержимого флакона отличается от температуры окружающей среды, что также приводит к высокой вероятности неравномерного образования льда. На **ФИГ. 2** показан профиль замораживания среды для криоконсервации, замороженной с использованием описанной выше последовательности замораживания.

Пример 2. Оптимизированная криоконсервация клеток млекопитающих в контейнере вместимостью 50 мл.

[204] В данном примере показан способ криоконсервации клеток млекопитающих в контейнере вместимостью 50 мл, таком как АТ-флаконы вместимостью 50 мл, при котором влияние скрытой теплоты плавления сводится к минимуму.

[205] Сначала было составлено 36 мл CAR-NK-клеток в среде, содержащей 40% PLASMA-LYTE A+10% HSA+50% CS10 в концентрации 110 миллионов клеток на мл, а затем залито в АТ-флакон вместимостью 50 мл. Температура флакона была снижена до 4°C в устройстве для замораживания с регулируемой скоростью. Для этих экспериментов использовался прибор CryoMed 5474 с регулируемой скоростью замораживания. Для начала процесса криоконсервации температура была снижена до -2°C со скоростью 1°C в минуту. Внутренняя температура флакона и его содержимого уравнивалась при -2°C в течение 3 минут. Процесс образования центров кристаллизации льда вызывался быстрым снижением температуры до -60°C со скоростью 25°C в минуту. Внутренняя поверхность флакона и его содержимое уравнивались при температуре -60°C в течение 1 минуты для поглощения скрытой теплоты плавления в результате образования льда для поддержания температуры клеточной суспензии ниже точки замерзания во избежание повторного плавления льда. Во избежание ускоренного образования внеклеточного льда, приводящего к нежелательному образованию внутриклеточного льда, температура была повышена до -30°C со скоростью 10°C в минуту для обеспечения непрерывного плавного снижения температуры с целью постепенного образования внеклеточного льда, в то время как внутриклеточная вода продолжала выводиться путем осмоса. Температура поддерживалась на уровне -30°C для равномерного замораживания клеток. В завершение температура была снижена до -40°C со скоростью 1°C в минуту. Содержимое клеток уравнивали при $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение 5 минут для максимального образования внеклеточного льда. Температура снижалась до конечной температуры -80°C со скоростью 10°C в минуту, чтобы дать возможность образоваться остаточному

внечелочному льду. Количество тепла, выделяемого образцами, температура в камере и температура в системе отображались на графике как функция времени. На **ФИГ. 3** показан профиль замораживания CAR-NK-клеток.

[206] Было замечено, что количество тепла, выделяемого содержимым клеток, оставалось практически постоянным на протяжении всего протокола замораживания, что свидетельствует о значимом снижении скрытой теплоты плавления. Кроме того, время, затрачиваемое на последовательность размораживания, не превышало 1 час.

Пример 3. Криоконсервация клеток млекопитающих в нескольких контейнерах вместимостью 50 мл.

[207] В данном примере показан способ криоконсервации клеток млекопитающих (например, клеток, подходящих для клеточной терапии) в пяти контейнерах вместимостью 50 мл, таких как АТ-флаконы вместимостью 50 мл, расположенных по четырем углам и в центре таким образом, чтобы влияние скрытой теплоты плавления было сведено к минимуму.

[208] Сначала было предоставлено пять контейнеров с 45 мл iCAR-T-клеток в соответствующей суспензионной среде для криоконсервации, содержащей клетки в концентрации 80 миллионов клеток/мл в АТ-флаконе вместимостью 50 мл. Температура флакона была снижена до 4°C в оборудовании для регулируемого замораживания CryoMed 5474. Для начала процесса криоконсервации температура была снижена до -2°C со скоростью 1°C в минуту. Внутренняя температура флакона и его содержимого уравнивалась при -2°C в течение 3 минут. Процесс образования центров кристаллизации льда запускался путем быстрого снижения температуры до -60°C со скоростью 25°C в минуту. Внутренняя поверхность флакона и его содержимое уравнивались при температуре -60 °C в течение 1 минуты для поглощения скрытой теплоты плавления в результате образования льда и поддержания температуры клеточной суспензии ниже точки замерзания во избежание повторного плавления льда. Во избежание ускоренного образования внечелочного льда, приводящего к нежелательному образованию внутривнечелочного льда, температура была повышена до -30 °C со скоростью 10 °C в минуту для обеспечения непрерывного плавного снижения температуры с целью постепенного образования внечелочного льда, в то время как внутривнечелочная вода продолжала выводиться путем осмоса. Температура поддерживалась на уровне -30°C для равномерного замораживания клеток. В завершение температура была снижена до -40 °C со скоростью 1°C в минуту. Для максимального образования внечелочного льда содержимое клеток уравнивали при температуре -40 °C в течение 5 минут. Температуру снижали до конечной температуры -80 °C со скоростью 10 °C в минуту, чтобы дать возможность образоваться остаточному внечелочному льду. Количество

тепла, выделяемого образцами, температура в камере и температура в системе отображались на графике как функция времени. На **ФИГ. 4** показан профиль замораживания пяти суспензий CAR-NK-клеток вместимостью 45 мл.

[209] Было замечено, что количество тепла, выделяемого содержимым всех пяти клеточных суспензий объемом 45 мл, оставалось практически постоянным на протяжении всего протокола замораживания, что свидетельствует о значимом снижении влияния скрытой теплоты плавления, создаваемой при образовании внеклеточного льда. Кроме того, использование нескольких камер позволило предположить, что протокол замораживания может быть масштабирован для больших количеств клеточных суспензий млекопитающих.

Пример 4. Размораживание криоконсервированных клеток млекопитающих.

[210] В данном примере показан способ размораживания клеток млекопитающих, хранившихся при температуре жидкого азота (-196°C), для снижения летальных последствий рекристаллизации льда. Измеряли жизнеспособность размороженных клеток.

[211] Клетки iCART при плотности клеток в 80 миллионов на мл и 120 клеток/мл, отобранные в трех различных объемах в 16, 30 и 45 мл в АТ-флаконы вместимостью 50 мл, были сначала криоконсервированы методом снижения скрытой теплоты плавления, а затем заморожены в АТ-флаконах вместимостью 50 мл и хранились при -196°C. Клетки, хранившиеся при температуре -196°C, размораживали, помещая АТ-флаконы в водяную баню с орбитальным шейкером (Benchmark SBL-12), настроенную на 60°C, при скорости вращения 120 об./мин на время до 600 секунд. При этом измерялась температура образца клеток. На **ФИГ. 5А** и **ФИГ. 5В** показано повышение температуры образца клеток в динамике в процессе размораживания АТ-флаконов вместимостью 50 мл, содержащих 16, 30 и 45 мл клеток.

[212] Оценивали жизнеспособность размороженных клеток. На **ФИГ. 6** показана жизнеспособность 80 миллионов клеток на мл и 120 миллионов клеток на мл, размороженных в соответствии с описанием. Было отмечено, что все клетки обладали жизнеспособностью более 95%, что свидетельствует об успешности данного способа предотвращения развития смертельно опасной рекристаллизации льда.

Пример 5. Эффективность замораживания и размораживания CAR-NK-клеток in vitro.

[213] В данном примере показана эффективность замораживания и размораживания CAR-NK-клеток млекопитающих в АТ-флаконах вместимостью 50 мл по сравнению с АТ-флаконами вместимостью 2 мл или криофлаконами вместимостью 2 мл, когда клетки млекопитающих были заморожены способом, минимизирующим скрытую теплоту плавления.

[214] Сначала в АТ-флаконы вместимостью 50 мл было отобрано 45 мл, 30 мл и 10

мл CAR-NK-клеток в концентрации 80 и 120 миллионов клеток на мл. Далее 1 мл CAR-NK-клеток помещали в АТ-флаконы вместимостью 2 мл при концентрации 80 и 120 миллионов клеток на мл или в криофлаконы вместимостью 2 мл при концентрации 10 миллионов клеток на мл в качестве контроля. Все клетки суспендировали в суспензионной среде для криоконсервации, содержащей 40% PLASMA-LYTE A, 50% CS10, 10% сывороточного альбумина человека.

[215] CAR-NK-клетки, разлитые в АТ-флаконы вместимостью 50 мл и 2 мл, замораживали следующим образом: температуру флакона снижали до 4°C и помещали в оборудование для регулируемого замораживания CryoMed 5474. Для начала процесса криоконсервации температура была снижена до -2°C со скоростью 1°C в минуту. Внутренняя температура флакона и его содержимого уравнивалась при -2°C в течение 3 минут. Процесс образования центров кристаллизации льда запускался путем быстрого снижения температуры до -60°C со скоростью 25°C в минуту. Внутренняя поверхность флакона и его содержимое уравнивались при температуре -60 °C в течение 1 минуты для поглощения скрытой теплоты плавления в результате образования льда и поддержания температуры клеточной суспензии ниже точки замерзания во избежание повторного плавления льда. Во избежание ускоренного образования внеклеточного льда, приводящего к нежелательному образованию внутриклеточного льда, температура была повышена до -30 °C со скоростью 10 °C в минуту для обеспечения непрерывного плавного снижения температуры с целью постепенного образования внеклеточного льда, в то время как внутриклеточная вода продолжала выводиться путем осмоса. Температура поддерживалась на уровне -30°C для равномерного замораживания клеток. В завершение температура была снижена до -40 °C со скоростью 1°C в минуту. Для максимального образования внеклеточного льда содержимое клеток уравнивали при температуре -40 °C в течение 5 минут. Температуру снижали до конечной температуры -80 °C со скоростью 10 °C в минуту, чтобы дать возможность образоваться остаточному внеклеточному льду. CAR-NK-клетки в криофлаконах вместимостью 2 мл были разделены на две группы, одна из которых была заморожена с использованием эталонной программы в качестве замороженного контроля, а другая - культивирована в культуральной среде в качестве свежего контроля.

[216] Замороженные клетки до размораживания хранили в паровой фазе резервуара с жидким азотом ($\leq -140^{\circ}\text{C}$). АТ-флаконы вместимостью 50 мл и 2 мл размораживали, помещая их в водяную баню с орбитальным шейкером (Benchmark SBL-12), установленную на 60°C, при скорости вращения 150 об./мин на время до 600 секунд. Клетки, замороженные в криофлаконах вместимостью 2 мл, размораживали при 37 °C в водяной бане с орбитальным шейкером (Benchmark SBL-12), установленной на 37 °C, при

скорости вращения 150 об./мин в течение до 600 секунд.

[217] Измерялась жизнеспособность клеток. Функциональность клеток проверялась путем измерения процента погибших CAR-NK-клеток при различных соотношениях Е:Т. Соотношение 10:1 относительно Е:Т было признано оптимальным для сравнения киллерной функции. В **таблице 1** приведены показатели жизнеспособности и функционального состояния CAR-NK-клеток. При измерении количества окрашенных погибших и жизнеспособных клеток было обнаружено, что более 93% клеток были жизнеспособными. Кроме того, было замечено, что клетки во флаконах вместимостью 50 мл при использовании описанной в настоящем документе последовательности замораживания и размораживания демонстрировали жизнеспособность, сопоставимую с жизнеспособностью свежих клеток и клеток при использовании эталонного метода замораживания и размораживания в отношении их киллерной функции (**ФИГ. 7А**). Кроме того, CAR-NK-клетки во флаконах вместимостью 50 мл при использовании описанной в настоящем документе последовательности замораживания и размораживания демонстрировали сопоставимые со свежими клетками иммунофенотипы (**таблица 2**). На **ФИГ. 7А** показан процент гибели CAR-NK-клеток в зависимости от соотношения Е:Т. В **таблице 2** показано сохранение иммунофенотипов в замороженных и размороженных CAR-NK-клетках.

[218] **Таблица 1. Функциональные данные, гибель и жизнеспособность *in vitro* CAR-NK-клеток, замороженных и размороженных в контейнерах вместимостью 50 мл в сравнении с флаконами вместимостью 2 мл.**

Образец	Тип контейнера	Концентрация клеток	Объем наполнения (мл)	% уничтожения при Е:Т=10:1	Замороженные/свежие*	Жизнеспособность
1	АТ 50 мл	120 моль/мл	16	87,2	1,04	93,8
2	АТ 50 мл	120 моль/мл	30	86,6	1,03	93,9
3	АТ 50 мл	120 моль/мл	45	86,9	1,03	93,8
4	АТ 2 мл	120 моль/мл	1,0	79,7	0,95	93,7
5	АТ 50 мл	80 моль/мл	16	87,2	1,04	94,0
6	АТ 50 мл	80 моль/мл	30	87,7	1,04	94,5
7	АТ 50 мл	80 моль/мл	45	86,5	1,03	94,1
8	АТ 2 мл	80 моль/мл	1,0	82,7	0,98	93,9
Свежие клетки				84,0	1,00	98,4
Замороженные клетки	Криофлакон 2 мл	10 моль/мл	1 мл	84,0	1,00	98,7

*Примечание. Значения столбца «замороженные/свежие» были получены в результате нормализации % гибели замороженных и свежих NK-клеток, полученных от одного и того же пациента

Таблица 2. Показано сохранение иммунофенотипов в CAR-NK-клетках, замороженных и размороженных во флаконах вместимостью 50 мл с использованием описанного в настоящем документе способа замораживания и размораживания.

Исследуемый маркер	Описание пакетной аналитики	Статистические данные	CAR-NK-1 16 мл нап.	CAR-NK -2 30 мл нап.	CAR-NK -3 45 мл нап.	CAR-NK -4 1 мл нап.	CAR-NK -5 16 мл нап.	CAR-NK -6 30 мл нап.	CAR-NK -7 45 мл нап.	CAR-NK -8 1 мл нап.	CAR-NK -9 UTD	CAR-NK -10 Свежие
CD56- CD48+ CD32+	(FITC+) (APC+)	Прародительский	0,00	0,00	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
CD56+ CD3-	(PE- Cy7-)	Родительский	97,84	97,90	98,31	97,51	97,10	98,05	98,06	95,96	98,08	98,14
CD3+	(PE- Cy7+)	Родительский	0,05	0,07	0,01	0,12	0,09	0,07	0,06	0,10	0,05	0,05
F(ab') ₂ + (NK- CAR)+	F(ab') ₂	Прародительский	50,64	49,07	50,48	48,20	50,50	50,19	51,25	48,60	1,51	47,93

Пример 6. Эффективность замораживания и размораживания CAR-NK-клеток in vivo.

[219] В данном примере показана эффективность in vivo замораживания и размораживания CAR-NK-клеток млекопитающих в АТ-флаконах вместимостью 50 мл по сравнению с АТ-флаконами вместимостью 2 мл или типовыми криофлаконами вместимостью 2 мл, когда клетки млекопитающих были заморожены способом, минимизирующим скрытую теплоту слияния. АТ-криофлаконы представляют собой криофлаконы собственной разработки, отличающиеся специальной технологией укупорки контейнера.

[220] Сначала в АТ-флаконы вместимостью 50 мл было заморожено 35 мл CAR-NK-клеток в концентрации 80 миллионов клеток на мл. Температуру флакона уменьшали до 4°C в оборудовании для регулируемого замораживания CryoMed 5474. Для начала процесса криоконсервации температура была снижена до -2°C со скоростью 1°C в минуту. Внутренняя температура флакона и его содержимого уравнивалась при -2°C в

течение 3 минут. Процесс образования центров кристаллизации льда запускался путем быстрого снижения температуры до -60°C со скоростью 25°C в минуту. Внутренняя поверхность флакона и его содержимое уравнивались при температуре -60°C в течение 1 минуты для поглощения скрытой теплоты плавления в результате образования льда и поддержания температуры клеточной суспензии ниже точки замерзания во избежание повторного плавления льда. Во избежание ускоренного образования внеклеточного льда, приводящего к нежелательному образованию внутриклеточного льда, температура была повышена до -30°C со скоростью 10°C в минуту для обеспечения непрерывного плавного снижения температуры с целью постепенного образования внеклеточного льда, в то время как внутриклеточная вода продолжала выводиться путем осмоса. Температура поддерживалась на уровне -30°C для равномерного замораживания клеток. В завершение температура была снижена до -40°C со скоростью 1°C в минуту. Для максимального образования внеклеточного льда содержимое клеток уравнивали при температуре -40°C в течение 5 минут. Температуру снижали до конечной температуры -80°C со скоростью 10°C в минуту, чтобы дать возможность образоваться остаточному внеклеточному льду. По завершении замораживания замороженные флаконы хранились в паровой фазе резервуара с жидким азотом. В *таблице 3* приведены компоненты среды для криоконсервации.

Таблица 3. Иллюстративные компоненты среды для криоконсервации.

Компоненты	Поставщик
PLASMA-LYTE A	Baxter
25% HSA	Shire
CryoStor® CS10	BioLife Solutions
Трегалоза	J. T. Baker

[221] Криоконсервированные клетки размораживали, помещая АТ-флаконы в водяную баню с орбитальным шейкером (Benchmark SBL-12), установленную на 60°C , при скорости вращения 150 об./мин на время до 600 секунд.

[222] Замороженные и размороженные CAR-NK тестировали на жизнеспособность, гибель и иммунофенотипы *in vitro*. Далее CAR-NK-клетки вводили самкам мышей NOD SCID Gamma (NSG), несущим ксенотрансплантаты человеческой лимфомы Беркета, экспрессирующие люциферазу клеток Раджи. Мыши линии NSG, самки, в возрасте 12 недель, были получены из The Jackson Laboratory. Эффективность протокола замораживания и размораживания CAR-NK-клеток *in vivo* оценивалась по их киллерной эффективности *in vivo* на иммунодефицитных мышах NOD/Shi-scid, IL-2R gamma null ("мыши NSG"). Активация естественных клеток-киллеров (NK-клеток) представляет собой антиген-зависимый процесс, приводящий к пролиферации и превращению NK-

клеток в эффекторные клетки. В качестве отрицательного контроля использовался PBS.

[223] Эффективность CAR-NK-клеток *in vivo* проверяли на самках мышей NOD SCID Gamma (NSG), несущих ксенотрансплантаты человеческой лимфомы Беркета, экспрессирующие люциферазу клеток Раджи. 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 (1,5 Гр). 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. Активность люциферазы измеряли на живых мышах с помощью системы визуализации IVIS[®] Spectrum CT (PerkinElmer) после лечения. 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.

[224] На **ФИГ. 8** представлен график процента гибели *in vitro* при различных соотношениях Е:Т для клеток после размораживания в АТ-флаконах вместимостью 50 мл и АТ-флаконах вместимостью 2 мл при количестве клеток 6 миллионов и 80 миллионов в двух средах для криоконсервации: 40% PLASMA-LYTE A, 10% HSA, 50% CS10 с 30 ммоль трегалозы или без нее. Было отмечено, что замороженные клетки в АТ-флаконах вместимостью 50 мл демонстрируют сопоставимую киллерную функцию (**ФИГ. 8**). В **таблице 4** представлены процентные значения гибели клеток при соотношении Е:Т 10:1, а также процентная жизнеспособность и восстановление CAR-NK-клеток, замороженных и размороженных с использованием описанной в настоящем документе последовательности. Было обнаружено, что CAR-NK-клетки в АТ-флаконах вместимостью 50 мл показали высокую жизнеспособность ($\geq 97,0\%$), сопоставимую с жизнеспособностью CAR-NK-клеток, замороженных в АТ-флаконах вместимостью 2 мл. В **таблице 5** представлены данные о сохранении фенотипов CAR-NK-клеток, замороженных во флаконах вместимостью 50 мл по сравнению с флаконами вместимостью 2 мл. Было обнаружено, что у CAR-NK, замороженных в АТ-флаконах вместимостью 50 мл, иммунные фенотипы сохранялись в той же степени, что и у CAR-NK-клеток, замороженных в АТ-флаконах вместимостью 2 мл.

[225] На **ФИГ. 9** дополнительно показана эффективность CAR-NK-клеток *in vivo* через 36 дней после введения CAR-NK клеток. Три разных образца CAR-NK-клеток (например, полученных от разных доноров) были протестированы на эффективность *in vivo*. В этих исследованиях использовались два различных состава: 1) 40% PLASMA-LYTE A, 10% HSA, 50% CS10 (Т6); и 2) 40% PLASMA-LYTE A, 10% HSA, 50% CS10, 30 ммоль трегалозы (Т6Т). Мышам с отрицательным контролем вводили среды с клетками (плацебо). Было замечено, что у мышей, которым вводили NK-CAR-клетки, экспрессия люциферазы была менее интенсивной на 13/14-й и 20/21-й день (**ФИГ. 9G-ФИГ. 9I**).

Суммарный поток флуоресценции люциферазы в зависимости от времени показан на **ФИГ. 9D-ФИГ. 9F**. На **ФИГ. 9A-ФИГ. 9B** показана процентная выживаемость мышей по дням после лечения. Было замечено, что мыши, которым вводили свежие CAR-NK-клетки и CAR-NK-клетки, замороженные и размороженные в соответствии с описанной в настоящем документе последовательностью, показали сопоставимую выживаемость.

[226] **Таблица 4. Сводные данные о проценте жизнеспособности, восстановлении и проценте гибели CAR-NK-клеток в АТ-флаконах вместимостью 50 мл в сравнении с АТ-флаконами вместимостью 2 мл.**

Образец	Контейнер	Концентрация клеток	Объем наполнения (мл)	Состав	% уничтожения @ E:T=10:1	Жизнеспособность (%)	% восстановления
CAR-NK-1	АТ-флакон 50 мл	6 моль/мл	35	40% PLASMA-LYTE A, 10% HSA, 50%CS10	93,01	97,3	100,2
CAR-NK-2	АТ-флакон 2 мл	80 моль/мл	1		92,77	97,2	94,7
CAR-NK-3	АТ-флакон 2 мл	6 моль/мл	1		89,76	96,6	109,5
CAR-NK-4	АТ-флакон 50 мл	6 моль/мл	35	40% PLASMA-LYTE A, 10% HSA, 50% CS10, 30 ммоль трегалозы	92,17	97,7	106,5
CAR-NK-5	АТ-флакон 2 мл	80 моль/мл	1		92,77	97,6	97,6
CAR-NK-6	АТ-флакон 2 мл	6 моль/мл	1		91,69	98,3	109,1

[227] **Таблица 5. Сводная характеристика иммунофенотипов CAR-NK-клеток.**

Изучаемый маркер	Описание пакетной аналитики	Клеточная линия	CAR-NK	CAR-NK	CAR-NK	CAR-NK	CAR-NK	CAR-NK
			-DP-1 (50 мл АТ)	-DP-2 (2 мл АТ)	-DP-3 (2 мл АТ)	-DP-4 (50 мл АТ)	-DP-5 (2 мл АТ)	-DP-6 (2 мл АТ)
CD56-CD48+C D32+	CD56-(FITC+)(APC+)	Прародительский	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
CD56+C D3-	CD56+(PE-Cy7-)	Родительский	99,35	99,54	99,55	99,57	99,59	99,56

CD3+	(PE-Cy7+)	Родительский	0,09	0,07	0,11	0,12	0,12	0,12
F(ab') ₂ +(NK-CAR)+	F(ab') ₂	Прародительский	72,45	72,82	72,28	72,98	72,55	73,19
40% PLASMA-LYTE A, 10% HSA, 50%CS10						40% PLASMA-LYTE A, 10% HSA, 50% CS10, 30 ммоль трегалозы		

Пример 7. Лечение нуждающегося субъекта с помощью CAR-NK-клеток, замороженных, транспортированных, размороженных, введенных из флакона

[228] 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.

[229] 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 по следующей программе замораживания, включающей в себя: (a) 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 °C ниже второй температуры; (d) повышение третьей температуры до четвертой температуры при третьей регулируемой скорости, где четвертая температура по меньшей мере на 20 °C выше третьей температуры; (e) снижение четвертой температуры до пятой температуры при четвертой регулируемой скорости, где пятая температура по меньшей мере на 10 °C ниже четвертой температуры; и (f) снижение пятой температуры до конечной температуры при пятой регулируемой скорости, где конечная температура меньше или равна -80 °C. Как правило, весь процесс замораживания длится менее 1 часа.

[230] После того как клетки заморожены, образец хранится при температуре -140 °C 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 °C 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.

[231] Когда клетки потребуются для использования, например, для проведения аллогенной клеточной терапии, клетки транспортируют из пункта хранения с криогенными условиями в больницу или другое место, где пациент ожидает пересадки клеток из транспортного контейнера с криогенными условиями. В процессе транспортировки клетки поддерживаются при температуре $-140\text{ }^{\circ}\text{C}$ или ниже до тех пор, пока они не попадут в больницу или другое место (например, в пункт оказания медицинской помощи). По прибытии на место клетки размораживают. Клетки можно разморозить следующим образом: нагреть контейнер, содержащий криоконсервированные сконструированные иммунные клетки, до температуры от $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ до $70\text{ }^{\circ}\text{C}$; 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 $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ до $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ 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.

[232] 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

[233] 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. Крупномасштабный способ криоконсервации иммунных клеток, включающий в себя:

обеспечение контейнера, содержащего образец, содержащий иммунные клетки, суспендированные в среде для криоконсервации, причем объем образца по меньшей мере на 5 процентов меньше полной вместимости контейнера, и при этом объем образца составляет по меньшей мере 10 мл;

охлаждение контейнера от температуры выше температуры замораживания образца до температуры около $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ или ниже в ходе многоэтапного процесса с регулируемой скоростью для минимизации скрытой теплоты плавления;

хранение клеток в паровой фазе жидкого азота, тем самым обеспечивая криоконсервацию иммунных клеток.

2. Способ по п. 1, в котором регулируемая скорость для минимизации скрытой теплоты плавления включает в себя два или более этапов снижения температуры со скоростью от $0,75\text{ }^{\circ}\text{C}$ в минуту до $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ в минуту до конечной температуры $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ или ниже.

3. Способ по любому из пп. 1-2, в котором общее время для достижения криоконсервации иммунных клеток составляет менее 120 минут, менее 110 минут, менее 100 минут, менее 90 минут, менее 80 минут, менее 70 минут или менее 60 минут.

4. Способ по любому из предыдущих пунктов, в котором иммунные клетки представляют собой свежeweделенные или по меньшей мере однократно замороженные и размороженные клетки.

5. Способ по п. 1, в котором иммунные клетки представляют собой естественные или сконструированные естественные клетки-киллеры (NK-клетки), альфа-бета Т-клетки, гамма-дельта Т-клетки, индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (иПСК), Т-или NK-клетки, полученные из иПСК, регуляторные Т-клетки (Трег), гемопоэтические стволовые клетки (ГСК), мезенхимальные стромальные клетки (МСК), дендритные клетки, макрофаги или В-клетки.

6. Способ по п. 1, в котором иммунные клетки представляют собой NK-клетки, полученные из пуповинной крови, сконструированные с химерным антигенным рецептором (CAR).

7. Способ по п. 1, в котором полная вместимость контейнера составляет около 50 мл.

8. Способ по п. 1, в котором полная вместимость контейнера составляет около 50 мл, а объем образца - менее 40 мл.

9. Способ по п. 8, в котором объем образца составляет около 10 мл, около 15 мл, около 20 мл, около 25 мл, около 30 мл, около 31 мл, около 32 мл, около 33 мл, около 34 мл, около 35 мл, около 36 мл, около 37 мл, около 38 мл, около 39 мл, около 40 мл, около 41 мл, около 42 мл, около 43 мл, около 44 мл или около 45 мл.

10. Способ по любому из пп. 1-9, в котором контейнер представляет собой

криофлаконе или криомешок.

11. Способ по п. 10, в котором контейнер представляет собой криомешок.
12. Способ по п. 11, в котором внутренний размер криофлакона составляет от около 10 мм до около 18 мм.
13. Способ по п. 12, в котором внешний размер криофлакона составляет около 13,5 мм.
14. Способ по п. 11, в котором высота криофлакона составляет от около 40 мм до 50 мм.
15. Способ по п. 14, в котором высота криофлакона составляет около 48,3 мм.
16. Способ по любому из пп. 1-15, в котором контейнер резистентный к ДМСО.
17. Способ по любому из предыдущих пунктов, в котором иммунные клетки присутствуют в концентрации от около 6 до 120 миллионов клеток на мл.
18. Способ по любому из предыдущих пунктов, в котором среда для криоконсервации содержит криопротектор, альбумин, дисахарид, а также непирогенный и изотонический кристаллоидный раствор.
19. Способ по любому из пп. 1-18, в котором среда для криоконсервации содержит сывороточный альбумин человека (HSA), хлорид натрия, глюконат натрия, тригидрат ацетата натрия, хлорид калия, хлорид магния, диметилсульфоксид (ДМСО) и трегалозу.
20. Крупномасштабный способ криоконсервации иммунных клеток, включающий в себя:
 - нагревание водяной бани до температуры от 37 °С до 70 °С;
 - перенос контейнера, содержащего криоконсервированные иммунные клетки, по п. 1 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.
21. Способ по п. 20, в котором подходящий период времени составляет от 5 до 15 минут.
22. Способ по п. 21, в котором подходящий период времени составляет около 10 минут.
23. Способ по п. 20, в котором перемешивание выполняют в водяной бане с орбитальным шейкером.
24. Способ по п. 23, в котором перемешивание клеток в водяной бане с орбитальным шейкером выполняют со скоростью около 120-150 об./мин.
25. Способ по п. 23, в котором температура в водяной бане с орбитальным шейкером составляет около 50 °С, 55 °С, 60 °С, 65 °С, 70 °С или 75 °С.
26. Способ по п. 23, в котором температура в водяной бане с орбитальным шейкером составляет около 60 °С.
27. Способ по п. 20, в котором полная вместимость контейнера составляет около 50 мл, а объем образца - от около 8 до 45 мл.

28. Способ по п. 20, в котором иммунные клетки представляют собой естественные или сконструированные естественные клетки-киллеры (NK-клетки), альфа-бета Т-клетки, гамма-дельта Т-клетки, NK- или Т-клетки, полученные из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (иПСК), регуляторные Т-клетки (Трег), макрофаги, дендритные клетки, гемопоэтические стволовые клетки (ГСК), мезенхимальные стромальные клетки (МСК) или В-клетки.

29. Способ по п. 20, в котором криоконсервированные иммунные клетки представляют собой NK-клетки или Т-клетки, сконструированные таким образом, чтобы включать в себя химерный антигенный рецептор (CAR).

30. Способ по п. 20, в котором жизнеспособность размороженных иммунных клеток после размораживания составляет 90%, 95%, 97% или более.

31. Способ по п. 20, в котором размороженные иммунные клетки сохраняют функции *in vitro* и/или *in vivo*, схожие с таковыми свежесыведенных иммунных клеток.

32. Способ по п. 20, дополнительно включающий в себя этап введения размороженных иммунных клеток нуждающемуся в этом субъекту.

33. Способ изменения температуры образца, содержащего иммунные клетки, от первой температуры выше температуры замораживания образца до конечной температуры менее или равной $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, тем самым обеспечивая криоконсервацию образца при конечной температуре, включающий в себя следующие этапы:

помещение образца при первой температуре, превышающей температуру замораживания образца;

понижение первой температуры до второй температуры при первой регулируемой скорости, при этом вторая температура по меньшей мере на $2\text{ }^{\circ}\text{C}$ ниже первой температуры;

понижение второй температуры до третьей температуры при второй регулируемой скорости, при этом третья температура по меньшей мере на $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ ниже второй температуры;

повышение третьей температуры до четвертой температуры при третьей регулируемой скорости, при этом четвертая температура по меньшей мере на $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ выше третьей температуры;

понижение четвертой температуры до пятой температуры при четвертой регулируемой скорости, при этом пятая температура по меньшей мере на $10\text{ }^{\circ}\text{C}$ ниже четвертой температуры;

понижение пятой температуры до конечной температуры при пятой регулируемой скорости, при этом конечная температура составляет $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ или менее.

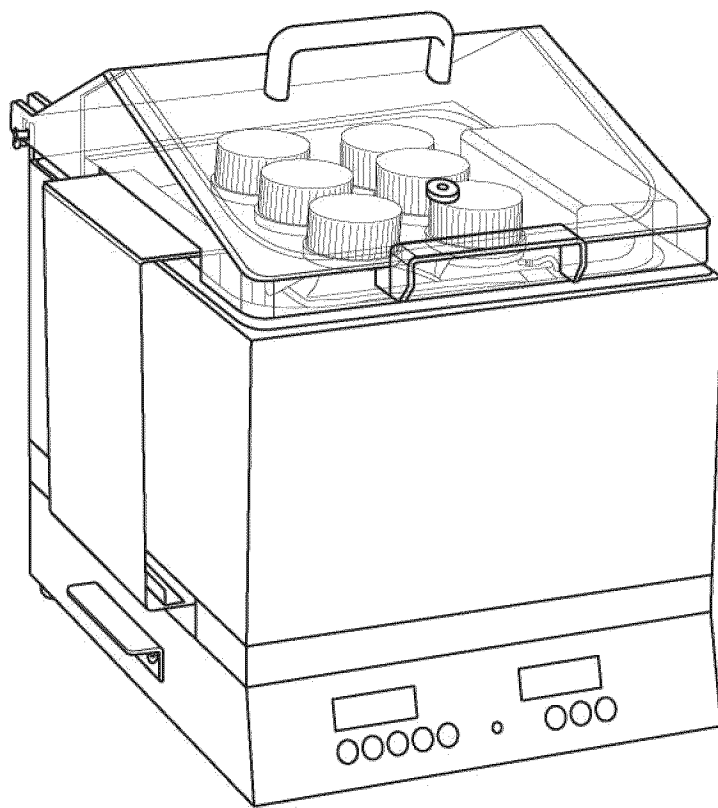
34. Способ по п. 33, в котором первая температура составляет от около $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ до $1\text{ }^{\circ}\text{C}$.

35. Способ по п. 33, в котором первая регулируемая скорость составляет от около $0,75\text{ }^{\circ}\text{C}$ до $1,25\text{ }^{\circ}\text{C}$ в минуту.

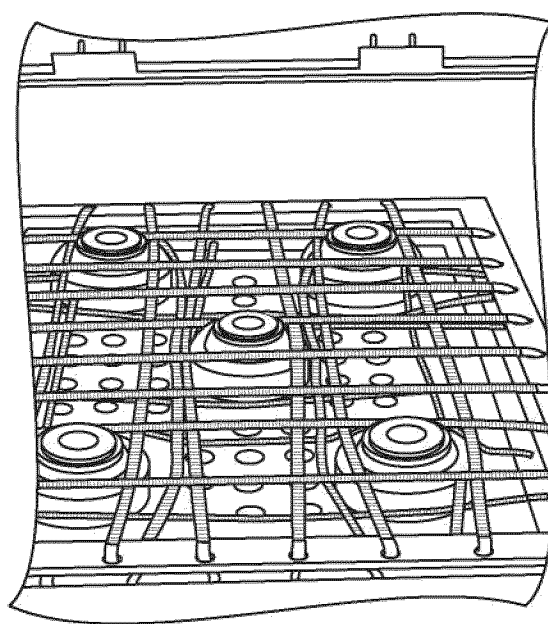
36. Способ по п. 33, в котором вторая температура составляет около $-2\text{ }^{\circ}\text{C}$.

37. Способ по п. 33, в котором вторая регулируемая скорость составляет от около 20 °С до 30 °С в минуту.
38. Способ по п. 33, в котором третья температура составляет около -60 °С.
39. Способ по п. 33, в котором третья регулируемая скорость составляет от около 5 °С до 15 °С в минуту.
40. Способ по п. 33, в котором четвертая температура составляет около -25 °С.
41. Способ по п. 33, в котором четвертая регулируемая скорость составляет от 0,75 °С до 1,25 °С в минуту.
42. Способ по п. 33, в котором пятая температура составляет около -40 °С.
43. Способ по п. 33, в котором пятая регулируемая скорость составляет от 7 °С до 15 °С в минуту.
44. Способ по п. 33, в котором конечная температура меньше или равна -80 °С.
45. Способ, включающий в себя криоконсервацию сконструированных иммунных клеток, пригодных для клеточной терапии, включающий в себя (1) обеспечение контейнера, содержащего образец иммунных клеток, суспендированных в среде для криоконсервации, причем объем образца по меньшей мере на 5% меньше полной вместимости контейнера, при этом объем образца составляет по меньшей мере 10 мл; и (2) поэтапное замораживание популяции сконструированных иммунных клеток при регулируемой скорости для минимизации воздействия скрытой теплоты плавления, причем поэтапное замораживание включает в себя охлаждение клеток со скоростью от 0,75 °С в минуту до 30 °С в минуту до конечной температуры -80 или ниже, тем самым обеспечивая криоконсервацию клеток.

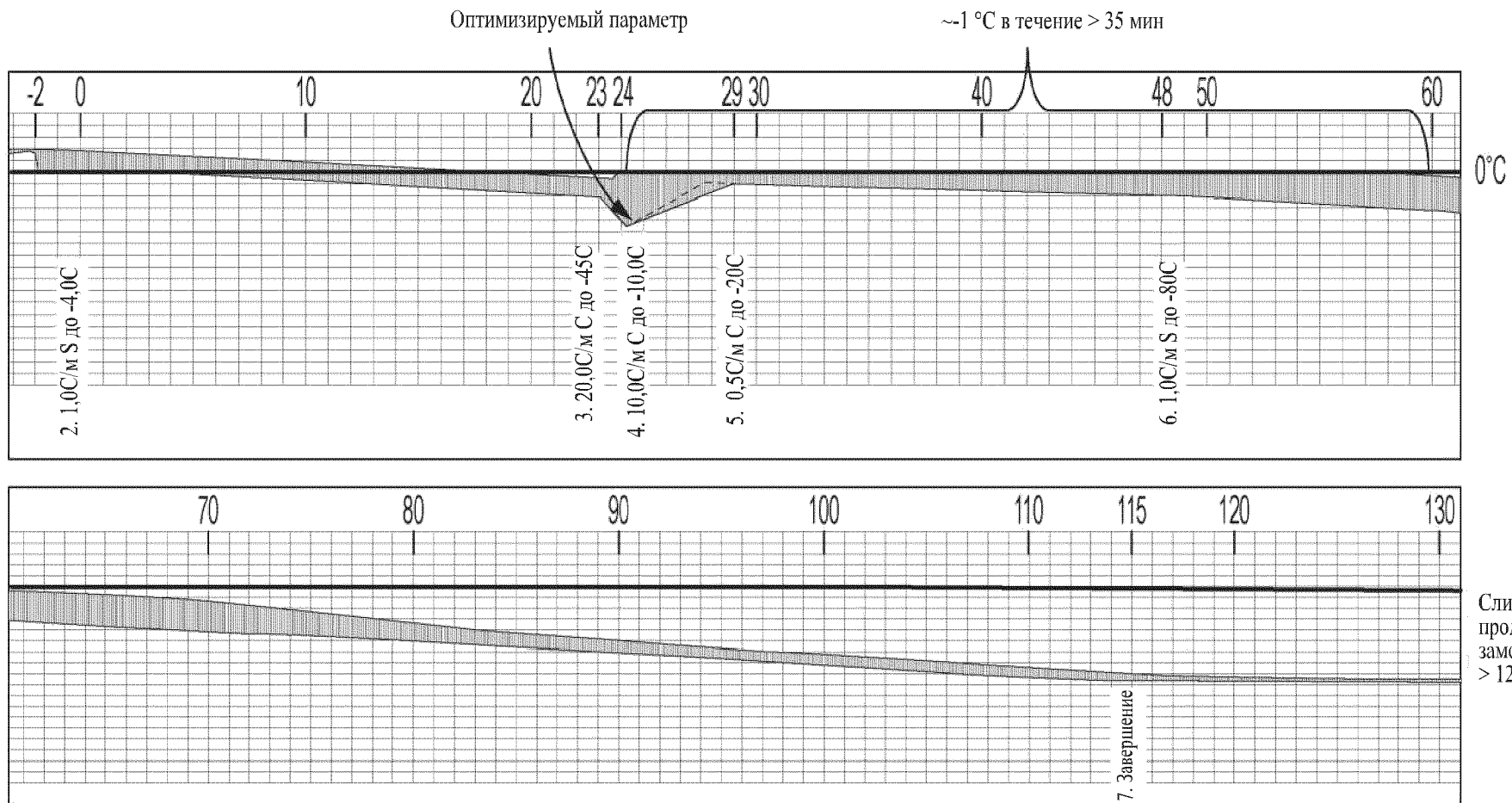
По доверенности



ФИГ. 1А

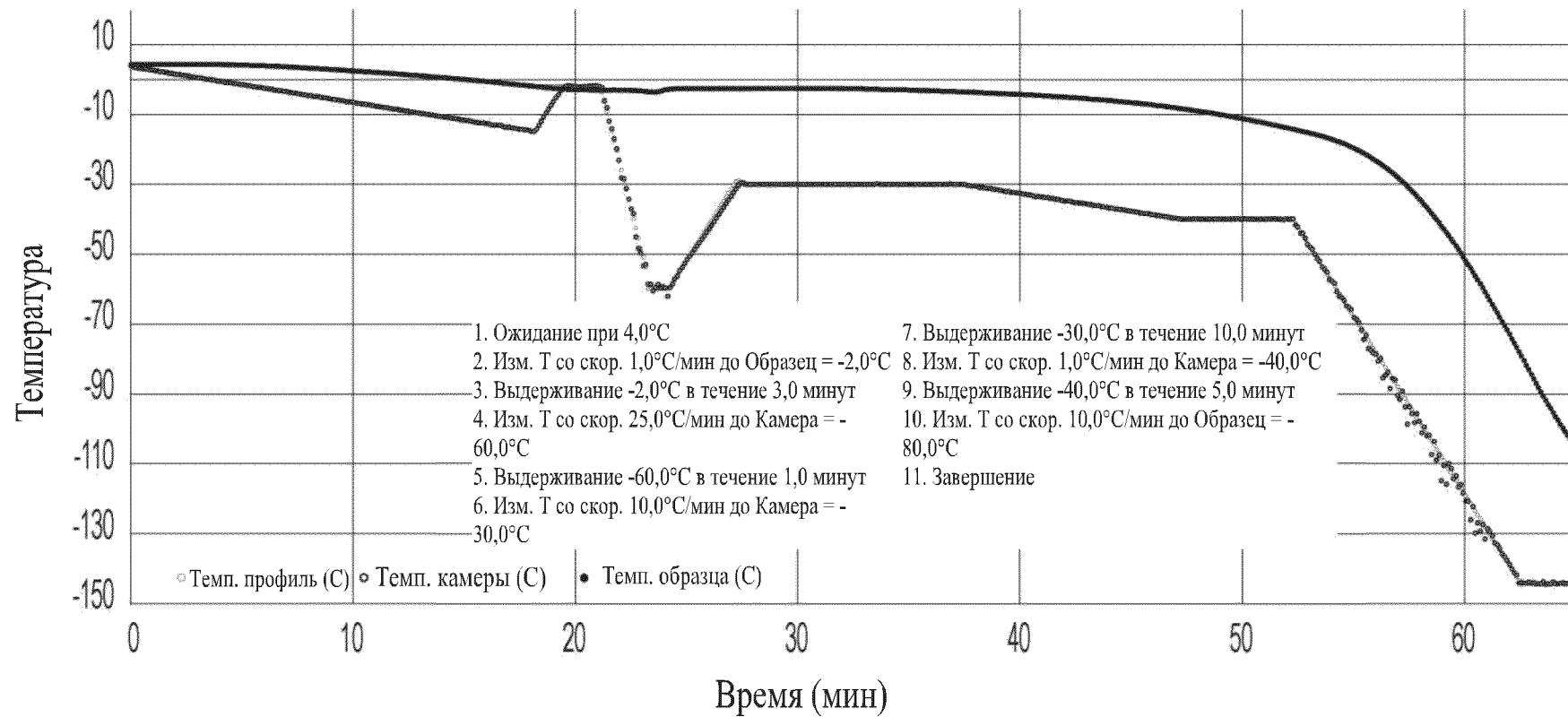


ФИГ. 1В



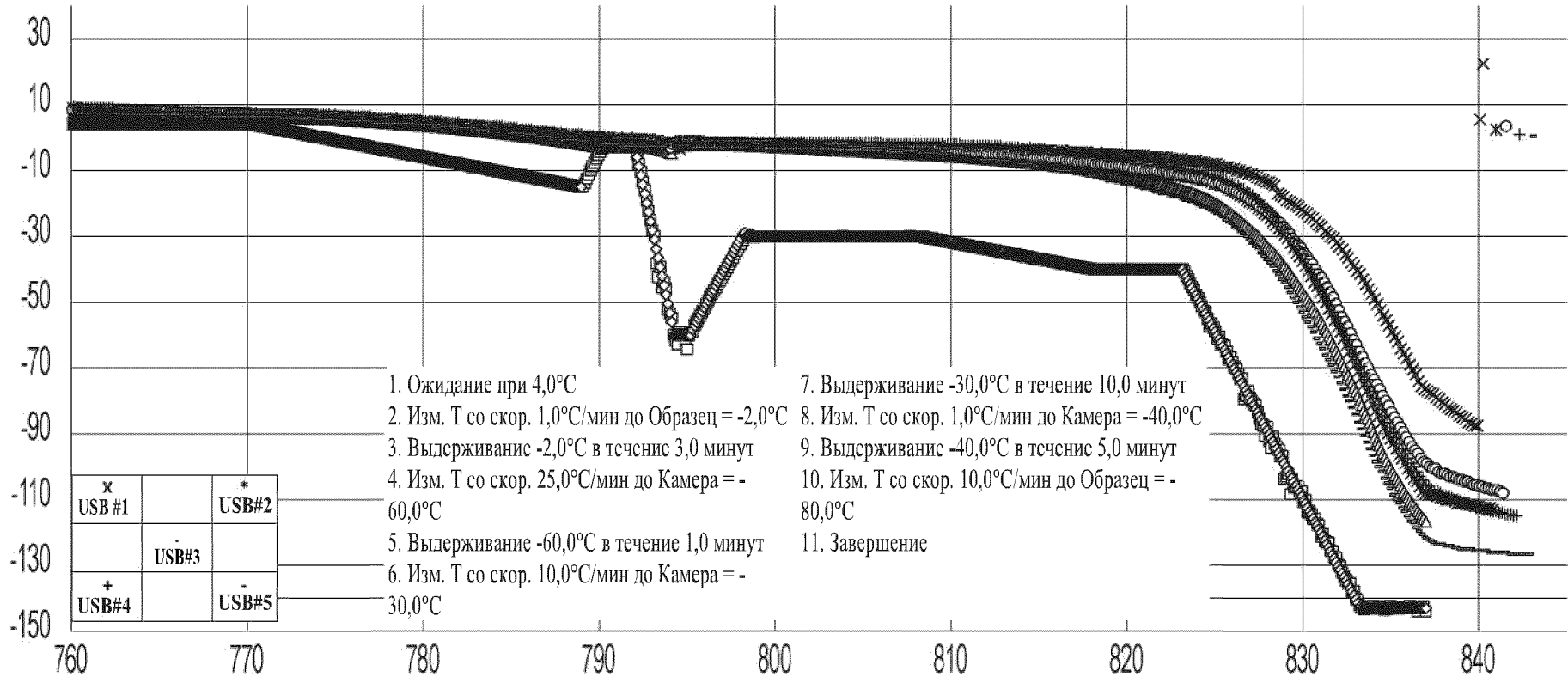
Фиг. 2

1. Ожидание при 4,0°C
2. Изм. T со скор. 1,0°C/мин до Образец = -4,0°C
3. Изм. T со скор. 20,0°C/мин до Камера = -45,0°C
4. Изм. T со скор. 10,0°C/мин до Камера = -10,0°C
5. Изм. T со скор. 0,5°C/мин до Камера = -20,0°C
6. Изм. T со скор. 1,0°C/мин до Образец = -80,0°C
7. Завершение

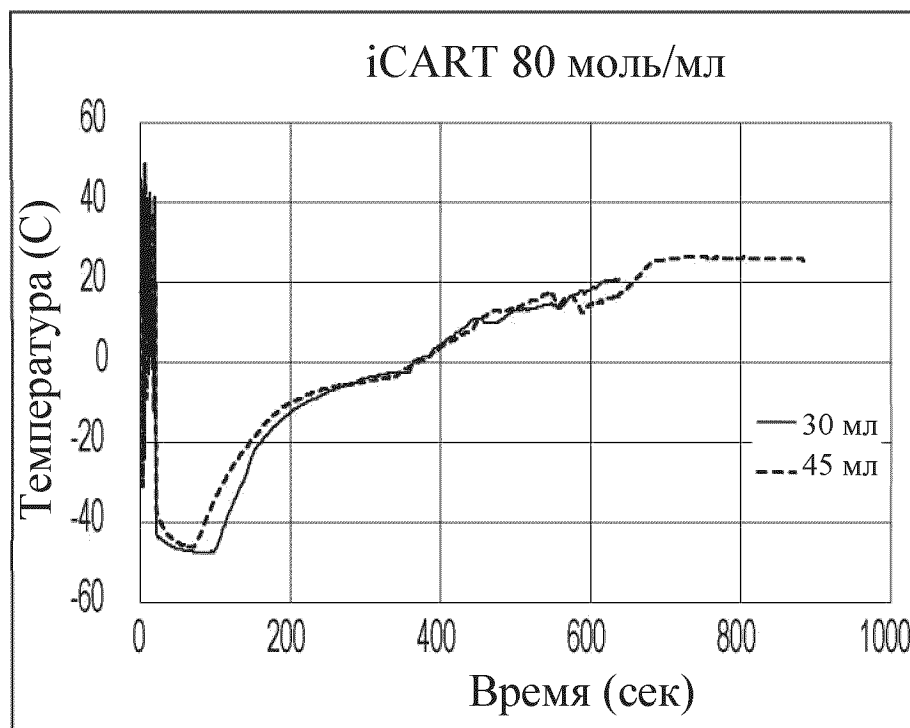


ФИГ. 3

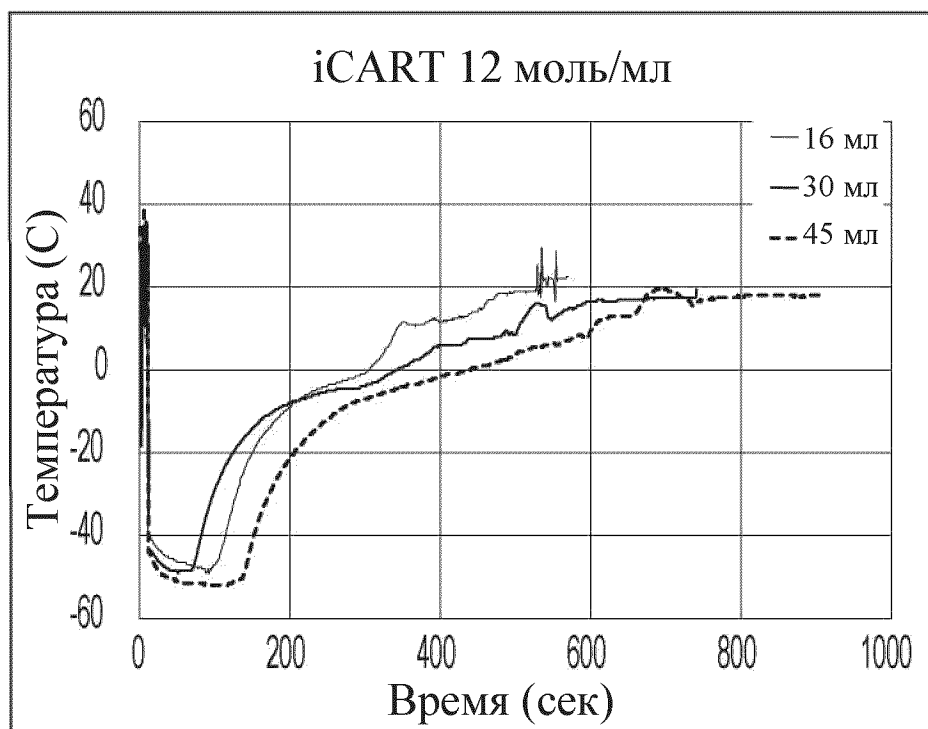
◇ Темп. профиль (С) → □ Темп. камеры (С) △ Темп. образца (С) × USB #1 * USB #2 ○ USB #3 + USB #4 - USB #5



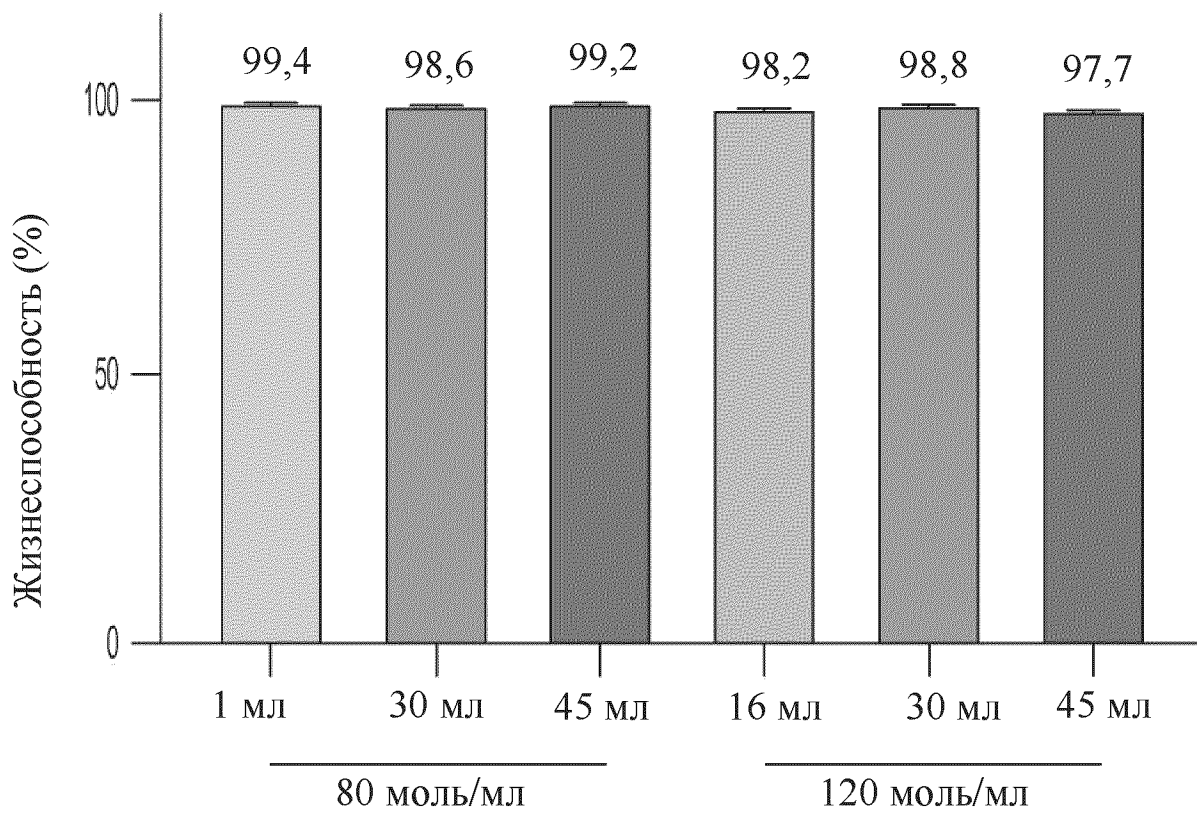
Фиг. 4



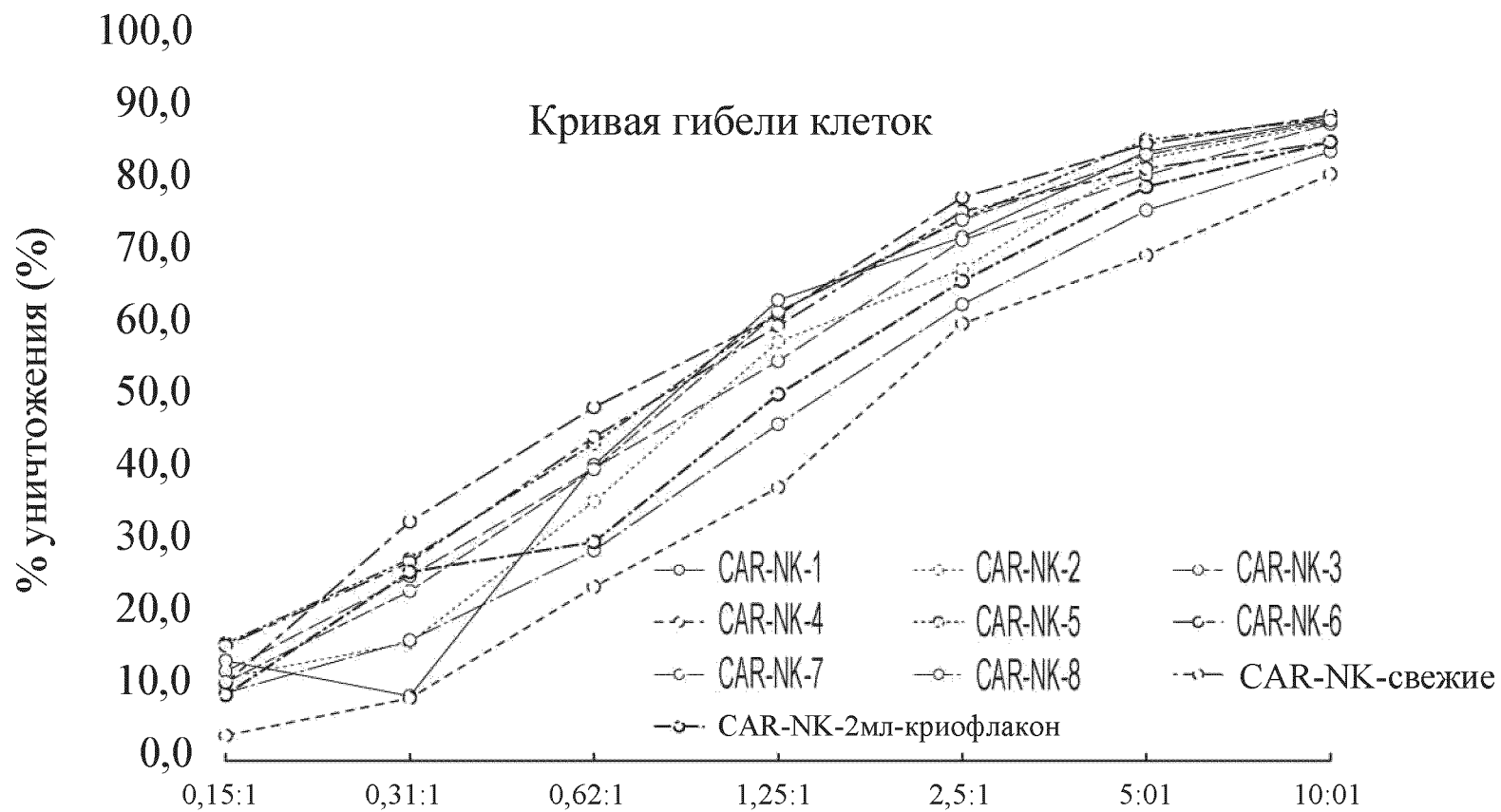
Фиг. 5А



Фиг. 5В



Фиг. 6

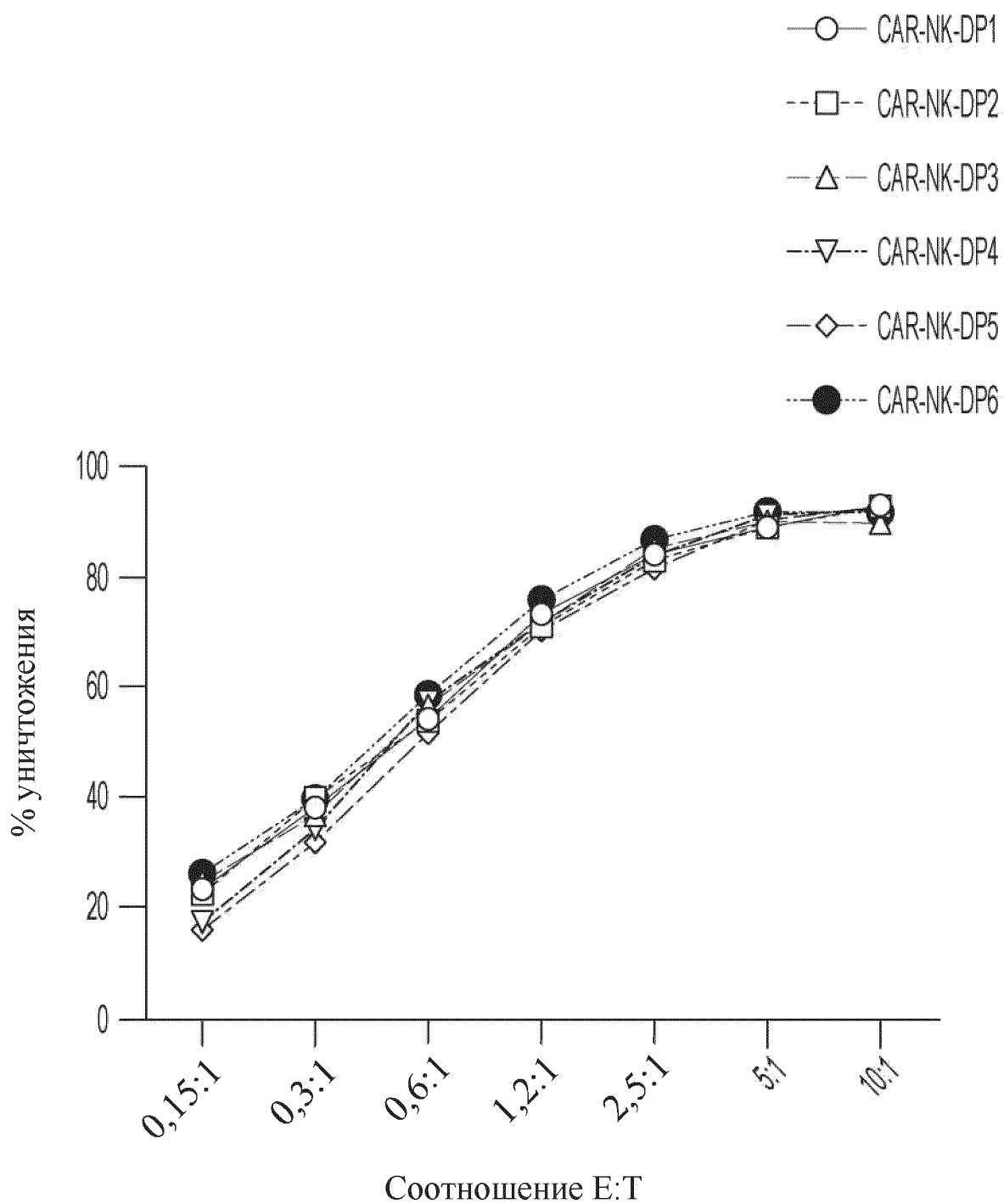


Фиг. 7А

Изучаемый маркер	CAR-NK-1 16 мл нап.	CAR-NK-2 30 мл нап.	CAR-NK-3 45 мл нап.	CAR-NK-4 1 мл нап.	CAR-NK-5 30 мл нап.	CAR-NK-6 16 мл нап.	CAR-NK-7 45 мл нап.	CAR-NK-8 1 мл нап.	CAR-NK- свежие	CAR-NK-2мл криофлакон
Популяция живых клеток (7AAD-)	41,87	42,66	46,43	47,01	46,65	43,86	48,96	42,41	53,61	40,80
CD56-CD48+CD32+	0,00	0,00	0,01	0,00	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	98,08	98,14
CD3+	0,05	0,07	0,01	0,12	0,09	0,07	0,06	0,10	0,05	0,05
F(ab') ₂ +(NK-CAR)+	50,64	49,07	50,48	48,20	50,50	50,19	51,25	48,60	1,51	47,93

8/15

Фиг.7В



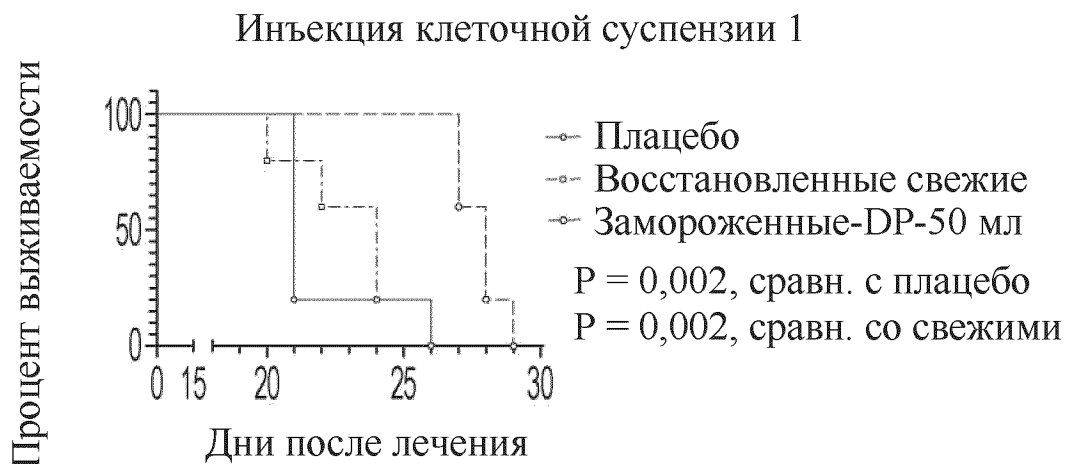
Фиг. 8А

Образец	Контейнер	Конц. клеток	Объем наполнения (мл)	Состав	% уничтожения @ E:T=10:1	Жизнеспособность (%)
CAR-NK-DP1	АТ-флаконы 50 мл	6 моль/мл	35	40% Plasmalyte+10%HS A+50%CS10	93,01	97,3
CAR-NK-DP2	АТ-флаконы 2 мл	80 моль/мл	1		92,77	97,2
CAR-NK-DP3	АТ-флаконы 2 мл	6 моль/мл	1		89,76	96,6
CAR-NK-DP4	АТ-флаконы 50 мл	6 моль/мл	35	40% Plasmalyte+10%HS A+50%CS10+30 ммоль трегалозы	92,17	97,7
CAR-NK-DP5	АТ-флаконы 2 мл	80 моль/мл	1		92,77	97,6
CAR-NK-DP6	АТ-флаконы 2 мл	6 моль/мл	1		91,69	98,3

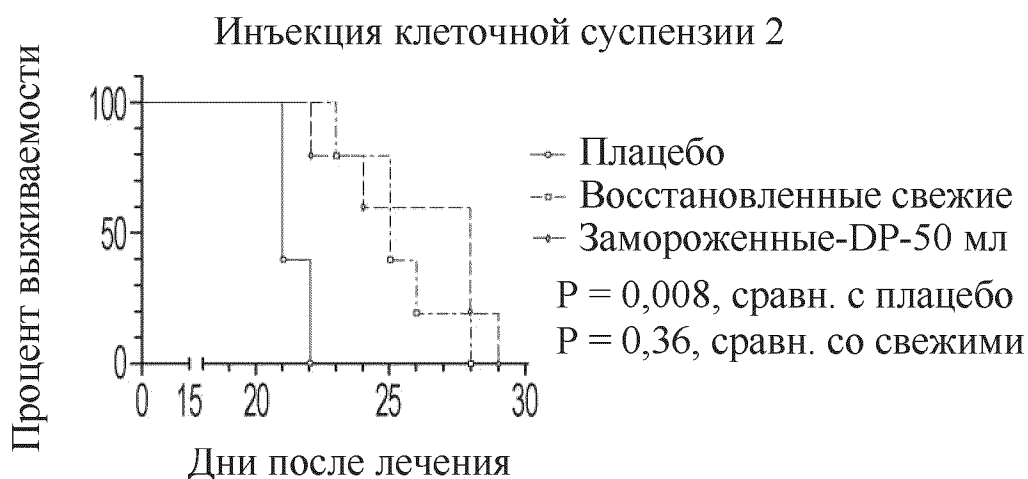
Фиг. 8В

Исследуемый маркер	CAR-NK 3-1	CAR-NK 3-2	CAR-NK 3-3	CAR-NK 3-4	CAR-NK 3-5	CAR-NK 3-6
Популяция живых клеток (7AAD-)	62,86	64,71	62,68	64,82	63,82	60,90
CD56-CD48+CD32+	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
CD56+CD3-	99,35	99,54	99,55	99,57	99,59	99,56
CD3+	0,09	0,07	0,11	0,12	0,12	0,12
F(ab') ₂ +(NK-CAR)+	72,45	72,82	72,28	72,98	72,55	73,19

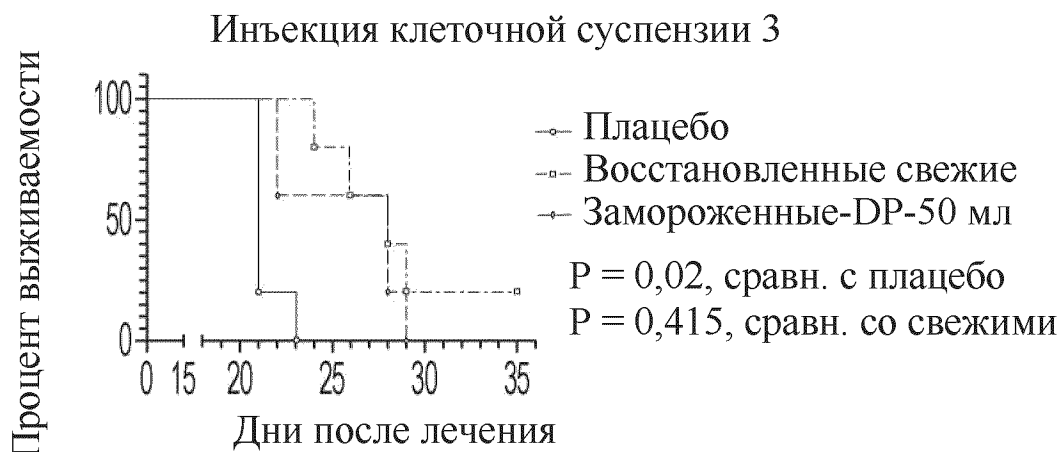
Фиг. 8С



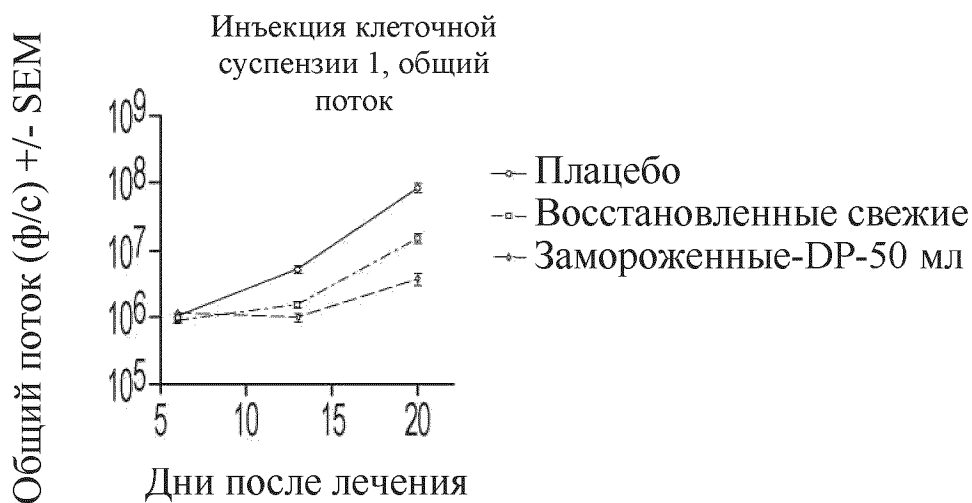
Фиг. 9А



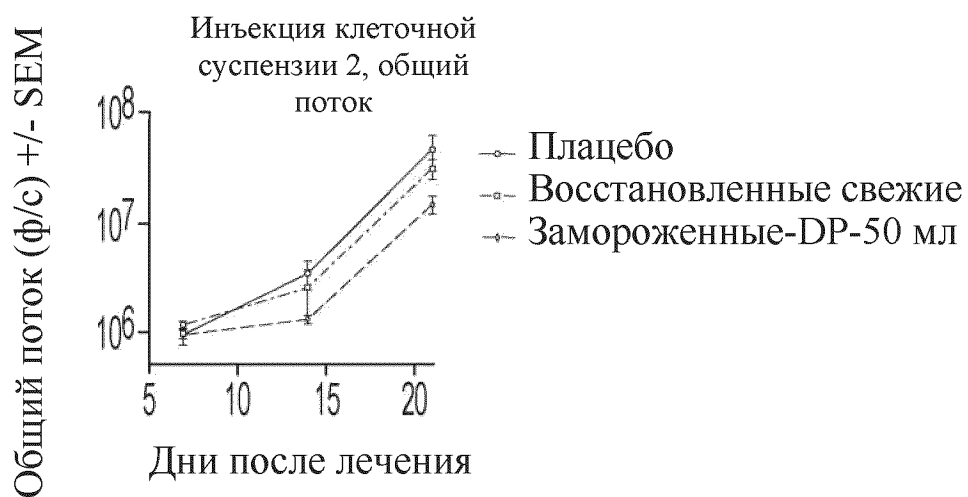
Фиг. 9В



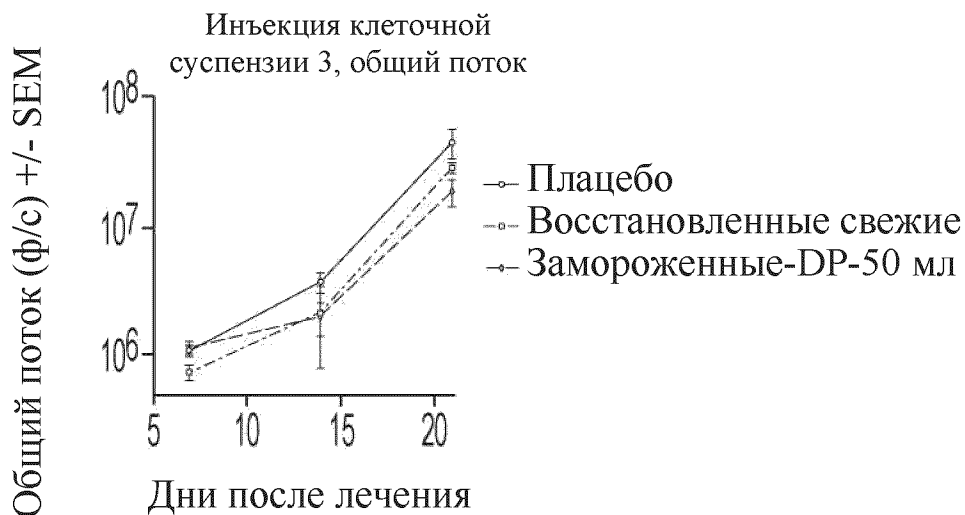
Фиг. 9С



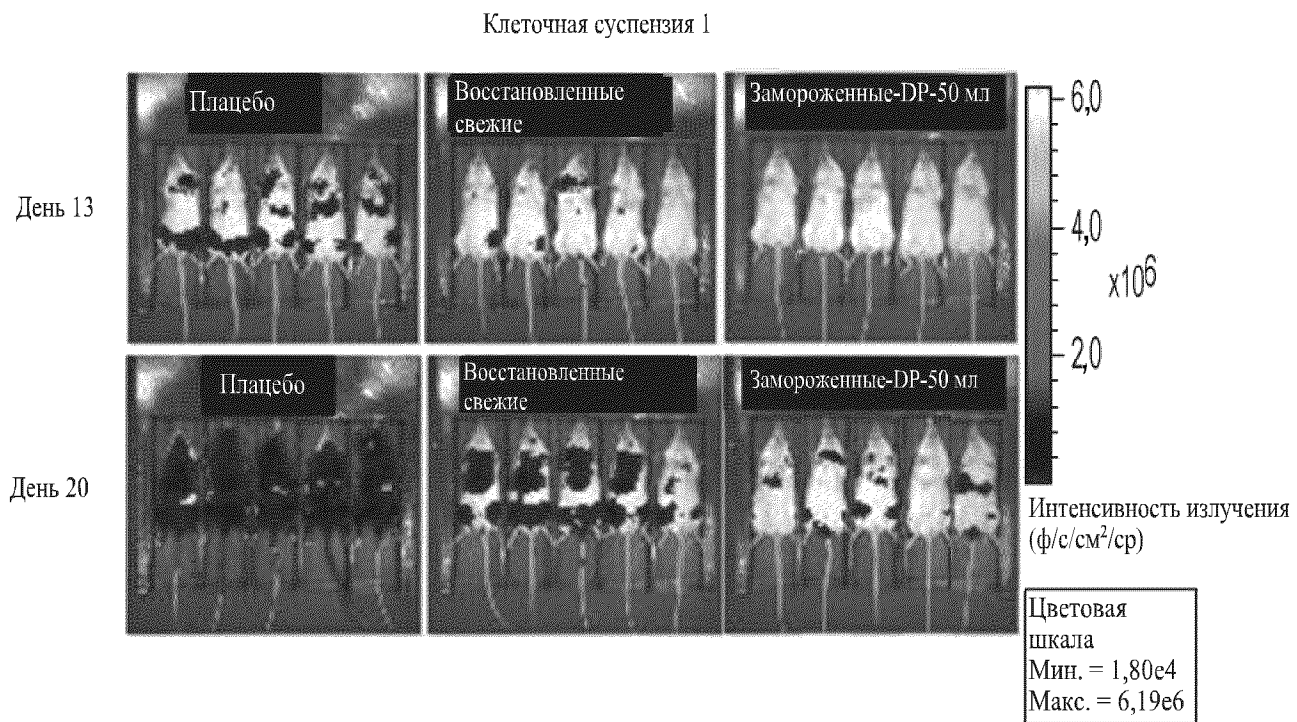
Фиг. 9D



Фиг. 9E

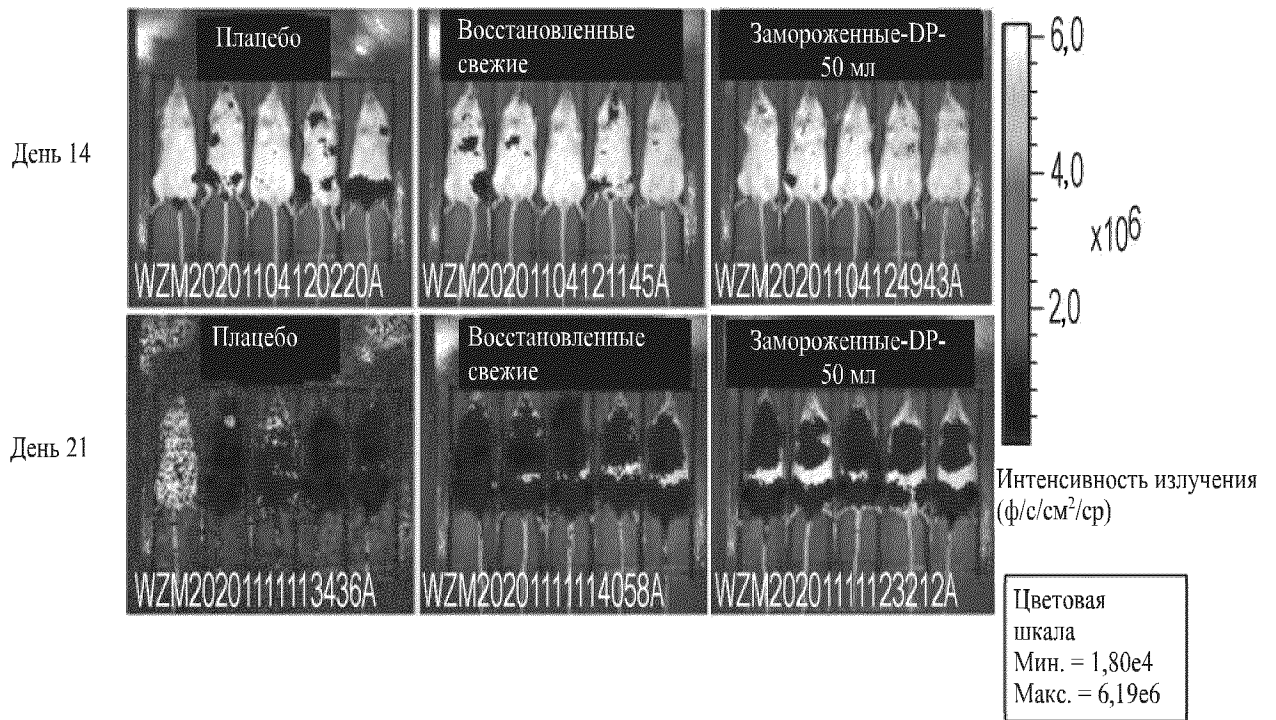


Фиг. 9F



Фиг. 9G

Клеточная суспензия 2



Фиг. 9H

Клеточная суспензия 3



Фиг. 9I