(19)国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 111386042 B
(45)授权公告日 2023.01.31

(21)申请号 201880076502.9
(22)申请日 2018.12.03
(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 111386042 A
(43)申请公布日 2020.07.07
(30)优先权数据
62/594,317 2017.12.04 US
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2020.05.27
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2018/063582 2018.12.03
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2019/112942 EN 2019.06.13
(73)专利权人 热生物制品有限公司
地址 美国北卡罗来纳
(72)发明人 D·哈勒特 T·斯克雷伯
(74)专利代理机构 北京市铸成律师事务所 11313
专利代理师 王丹丹 郭丽祥
(51)Int.Cl.
A01N 1/02(2006.01)
A61K 35/13(2015.01)
A61K 39/00(2006.01)
A61P 35/00(2006.01)
(56)对比文件
CN 1774255 A,2006.05.17
CN 105873639 A,2016.08.17
CN 101032631 A,2007.09.12
审查员 王克双

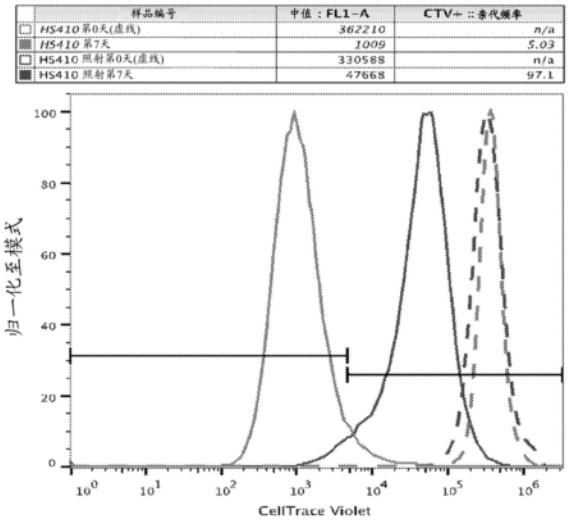
权利要求书1页 说明书20页
序列表6页 附图12页

(54)发明名称

基于细胞的疫苗的生产

(57)摘要

本公开提供了一种用于细胞保存的方法,例如将暴露于电离辐射的细胞冷冻保存。



CN 111386042 B

1.一种用于保存细胞的方法,所述方法包括:

a)在容器中获得新鲜收获的细胞,其中所述细胞表达修饰的且可分泌的疫苗蛋白;

b)使所述收获的细胞与液氮接触;

c)以120Gy的剂量向步骤b)的所述细胞施用电离辐射;以及

d)将辐射过的细胞储存在液氮中。

2.如权利要求1所述的方法,其中所述方法提高细胞活力。

3.如权利要求2所述的方法,其中所述方法提高细胞回收率。

4.如权利要求3所述的方法,其中向所述细胞施用IR使得细胞不能复制。

5.如权利要求4所述的方法,其中用γ辐射照射所述细胞。

6.如权利要求5所述的方法,其中当施用γ辐射时,所述细胞是非增殖性的。

7.如权利要求1所述的方法,其中所述修饰的且可分泌的疫苗蛋白是编码gp96-Ig的热激蛋白。

8.如权利要求1-7中任一项所述的方法,其中所述细胞是肿瘤细胞。

9.如权利要求8所述的方法,其中所述肿瘤细胞是肺或膀胱肿瘤细胞。

10.如权利要求9所述的方法,其中所述肿瘤细胞是viagenpumatucel-L。

11.如权利要求9所述的方法,其中所述肿瘤细胞是vesigenurtacel-L。

12.如权利要求1所述的方法,进一步包括在培养物中扩增所述细胞。

基于细胞的疫苗的生产

技术领域

[0001] 本公开涉及细胞保存,例如暴露于电离辐射的细胞的冷冻保存。

[0002] 相关申请的交叉引用

[0003] 本申请要求于2017年12月4日提交的美国临时专利申请号62/594,317的优先权和权益,所述申请的全部内容以引用方式整体并入本文。

[0004] 以电子方式提交的文本文件的描述

[0005] 在此以电子方式提交的文本文件的内容以引用方式整体并入本文:计算机可读格式的序列表副本(文件名:HTB-028PC_SequenceListing_ST25;记录日期:2018年11月28日;文件大小:13.6KB)。

背景技术

[0006] 将细胞储存在液氮中仍然是最安全的细胞保存方法。暴露于电离辐射(IR)的细胞的冷冻保存已显示会诱导对活细胞的损害,但是细胞对冷冻保存的反应知之甚少。当前的方法需要在细胞培养期间以规则间隔获得新鲜灭活的细胞,并且需要不断地接近辐射源。冷冻细胞的照射已证明可改善功能、均匀度并延长其功能寿命。照射的细胞在冷冻时不会受到辐射的影响,直至冷冻的细胞解冻。因此,为了保持细胞活力,所述过程需要与细胞培养物制造设施接近(并与之紧密整合)的照射设施。这种组合通常在工业放大规模上并不常见。由于此限制,存在对延长细胞寿命和功能性的方法的需求和改进。

发明内容

[0007] 本公开基于以下令人惊奇的发现,即照射冷冻保存后的癌症疫苗细胞保留了细胞活力和代谢功能。

[0008] 在一些方面,本公开提供了一种用于保存细胞的方法,所述方法包括在容器中获得新鲜收获的细胞;使收获的细胞与液氮接触;以及向所述细胞施用一定剂量的电离辐射(IR)。

[0009] 在一些实施方案中,所述方法还包括将细胞储存于液氮中。

[0010] 在一些实施方案中,所述方法提高细胞活力。

[0011] 在一些实施方案中,所述方法提高细胞回收率。

[0012] 在一些实施方案中,用γ辐射照射细胞。在一些实施方案中,对细胞的照射使细胞不能复制。在一些实施方案中,当施用γ照射时,细胞是非增殖性的。在一些实施方案中,所施用的辐射剂量在1(Gy)、5(Gy)、10(Gy)、20(Gy)、30(Gy)、40(Gy)、50(Gy)、60(Gy)、70(Gy)、80(Gy)、90(Gy)、100(Gy)、110(Gy)或120(Gy)之间,包括所有端点

[0013] 在一些实施方案中,所施用的辐射剂量为至少120(Gy)γ辐射。

[0014] 在一些实施方案中,细胞表达修饰的且可分泌的疫苗蛋白。在一些实施方案中,修饰的且可分泌的疫苗是热激蛋白,其是gp96-Ig。

[0015] 在一些实施方案中,细胞是肿瘤细胞,例如但不限于肺或膀胱肿瘤细胞。在一些实

施方案中，肿瘤细胞是Vesigenurtacel-L(HS-110)。在一些实施方案中，肿瘤细胞是Vesigenurtacel-L(HS-410)。

[0016] 在一些方面，所述方法提供了用于生产细胞，所述细胞包含编码修饰的且可分泌的疫苗蛋白的载体，所述细胞具有提高的细胞活力和/或细胞回收率。在一些实施方案中，所述细胞在培养中扩增。

[0017] 在一些方面，本发明涉及一种用于进行癌症治疗的方法，其通过：在容器中获得新鲜收获的细胞，其中所述细胞是肿瘤细胞，所述肿瘤细胞包含编码修饰的且可分泌的疫苗蛋白的载体；将收获的细胞与液氮接触；以及以至少120(Gy)的剂量向所述细胞施用一定剂量的电离辐射(IR)。在实施方案中，所述方法还包括将细胞储存在液氮中。在实施方案中，所述修饰的且可分泌的疫苗是gp96-Ig。在实施方案中，所述肿瘤细胞是vesigenurtacel-L(HS-110)或vesigenurtacel-L(HS-410)。

附图说明

[0018] 图1是示出Vesigenurtacel-L(HS-410)药物产品制造过程和测试(第2阶段过程)的图片。

[0019] 图2是示出低温箱中的箱构造和剂量计位置的图。对于B层(底部)、M层(中间)或T层(顶部)，随着冷却器在照射期间旋转，在每层的单一箱上进行剂量分布。因此，对于给定层的四个箱各自的相应小瓶位置而言，照射暴露是等效的。

[0020] 图3示出了以戈瑞/分钟(Gray per minute)为单位的照射剂量率分布结果。红色单元(Φ)表示低照射剂量，绿色单元(⊙)表示高照射剂量。

[0021] 图4是示出如通过CellTrace™Violet方法评估的照射和未照射的HS-410疫苗细胞的复制能力的直方图。未照射(红色Φ)和照射的(深蓝色Δ)HS-410细胞在第0天(虚线)和第7天(实线)的CTV概况，以及在指示的未照射细胞与照射细胞的比率下的掺杂样品在第7天的概况。

[0022] 图5示出了通过CTV测定评估的复制的照射位置和小瓶数量。红色单元(Φ)表示低照射水平，绿色单元(⊙)表示高照射水平。每个数字表示在指示的层中与冷却器中心的此相对位置处评估的小瓶数量。

[0023] 图6是示出照射使HS-410细胞不能复制(CTV测定)的直方图。在未照射(红色)和照射(蓝色)的HS-410细胞中第0天对比第7天(虚线对比实线)的CellTrace Violet荧光。通过调整设置闸控，直到第7天约95％的未照射细胞落入CTV闸。左侧实曲线是HS410第7天，而右侧实曲线是HS410 HD小瓶10001第7天。

[0024] 图7示出通过CFU测定评估的复制的照射位置和小瓶数量。

[0025] 图8是示出模拟照射研究的条形图。内部是左侧栏，并且外部是右侧栏。

[0026] 图9是显示照射使HS-110细胞不能复制的直方图。示出在照射后细胞复制状态的代表性数据。虚线表示第0天的细胞；实线峰表示培养七天后的细胞。红色(Φ)表示照射前的样品，并且蓝色(Δ)表示照射后的样品。左边阴影曲线是第7天的HS100，并且右边阴影曲线是第7天的HS110照射1.1。

[0027] 图10是示出在单个小瓶中冷冻保存之后照射的HS-110疫苗细胞的复制能力的一系列直方图。

[0028] 图11是描绘照射和冷冻方法的图。

[0029] 图12A-12B是示出照射/冷冻的细胞(Irr/Fr)对比冷冻/照射的细胞(Fr/Irr)的细胞回收率和活力的图。

[0030] 图13A-13B是示出照射/冷冻的细胞(Irr/Fr)对比冷冻/照射的细胞(Fr/Irr)的HLA-A1阳性细胞表达的图。图13A示出了HLA-A1阳性细胞百分比,并且图13B示出了在同种型和抗HLA-A1条件下的HLA-A1表达。

[0031] 图14A-14C是示出照射/冷冻的细胞(Irr/Fr)对比冷冻/照射的细胞(Fr/Irr)的GP96-Ig分泌的一系列折线图。图14A示出第1天的GP96-Ig分泌。图14B示出第3天的GP96-Ig分泌,并且图14C示出第5天的GP96-Ig分泌。

[0032] 图15是示出在未照射的细胞、照射/冷冻(Irr/Fr)的细胞和冷冻/照射的细胞(Fr/Irr)中的^{3}H-胸腺嘧啶核苷摄取的条形图。在每个系列中,从左到右的条形图顺序是未照射的细胞、照射/冷冻的细胞(Irr/Fr)和冷冻/照射的细胞(Fr/Irr)。

[0033] 图16是示出未照射的细胞、照射/冷冻的细胞(Irr/Fr)和冷冻/照射的细胞(Fr/Irr)的细胞单层的一系列图像。

具体实施方式

[0034] A.综述

[0035] 本公开基于以下发现,即照射冷冻保存后的癌症疫苗细胞出人意料地保留了细胞活力和代谢功能。本公开改进了细胞冷冻保存的标准方法,从而简化了靶细胞的细胞培养并使研究努力最大化,同时使细胞处理的时间和费用最小化。本发明方法提供了用于商业通用批量生产(GMP)设置中的优点,例如放大大型细胞库的生产并易于运输细胞的优点。自动化和商业放大解决了潜在的污染问题、有限的寿命、通道相关的代谢能力损失、质量控制和批次变化。从商业角度看,本发明方法提供了积极的益处,并将通过破坏或减少自然疾病进展的瞬时细胞疗法影响从常规细胞、组织和器官移植的应用。

[0036] 用于保存细胞的制造方案包括冷冻保存后的照射步骤。在干冰上用γ辐射照射小瓶中等分且冷冻保存的癌症疫苗细胞,这种照射已证明会破坏细胞的复制机制,使细胞不能复制,同时使它们在更长的时间段内保持代谢活性并产生免疫所需的伴侣蛋白-肽复合物。

[0037] 在一些实施方案中,本公开提供了一种用于保持细胞活力而不需要与细胞培养物制造设施接近(并与之紧密整合)的照射设施的改进方法。在一些实施方案中,所述方法提供了用于照射冷冻保存和/或冷冻的疫苗接种细胞的工业放大和生产的可行性。

[0038] 在一些实施方案中,所述方法确保照射使疫苗接种的细胞不能复制。在一些实施方案中,所述方法确保疫苗接种的细胞在照射后丧失增殖能力。

[0039] 在一些实施方案中,所述细胞含有包含编码可分泌疫苗蛋白的核苷酸序列的表达载体。在一些实施方案中,所述细胞包含编码修饰的且可分泌的热激蛋白(即,gp96-Ig)的载体。在一些实施方案中,所述细胞表达修饰的且可分泌的热激蛋白(即,gp96-Ig)。在一些实施方案中,本文提供的载体含有编码gp96-Ig融合蛋白的核苷酸序列。

[0040] B.定义

[0041] “低温保存”是通过冷却到非常低的温度(通常为使用固态二氧化碳得到的-80℃

或使用液氮得到的-196℃)来保存易受由未受调控的化学动力学引起的损伤影响的细胞器、细胞、组织、细胞外基质、器官或任何其他生物结构的过程。在足够低的温度下,可以有效地阻止可能对所讨论的生物材料造成损害的任何酶或化学活性。冷冻保存方法力求达到低温而不会在冷冻期间引起因结冰而造成的额外损害。

[0042] “培养细胞”通常是附着至培养底物并保持在37℃的常规细胞培养基(诸如DMEM、F-12、RPMI 1640或MCDB 153)中的哺乳动物细胞。

[0043] “培养-照射的细胞”是在连接到烧瓶、培养皿或小瓶后暴露于一定剂量的γ辐射,使得细胞不能进行有丝分裂的细胞。在这种情况下,γ对细胞的损害会立即开始,并且不能延迟。

[0044] “分化”是细胞的谱系或克隆成为特定细胞或组织类型的保证。分化与干细胞特性丧失同义。

[0045] “冷冻的细胞”是已收获、浓缩、重悬于冷冻保护剂培养基中并分配在小瓶或安瓿中的培养细胞。这些细胞被冻结并储存,直到需要。

[0046] “冷冻-照射的细胞”是在冷冻状态下暴露于一定剂量的γ射线,使得细胞不能进行有丝分裂的冷冻细胞。冷冻的细胞可以包装在碎干冰中、递送、照射、放回液氮中以便储存和日后使用或分配。

[0047] “冷冻”是在非常低的温度下冷却并储存细胞以保持细胞活力的过程。在非常低的温度下冷却并储存细胞的技术使得细胞存活率在解冻后很高。冷冻的细胞中常用的一种物质是液氮,其温度为约负196℃。

[0048] 哺乳动物细胞中的“γ诱导的损伤”是由高能的短波长光子和其他亚原子粒子的穿过造成,所述亚原子粒子使电子从它们所穿过的原子和分子中散射出来,从而产生过氧化物、自由基和其他化学反应性细胞毒性物质的痕迹。

[0049] “γ源”是允许将实验材料、细胞或生物体暴露于特定剂量的γ辐射的装置。

[0050] “戈瑞”或“(Gy)”的单位为焦耳/千克(J/kg),是吸收的剂量的SI单位,并且是在1千克任何种类的物质中沉积1焦耳能量所需要的辐射量。

[0051] I.基于细胞的疫苗的制造

[0052] 本发明提供了用于生产基于细胞的疫苗的组合物和方法,其提供了优于现有技术的方法的优点。

[0053] A.本发明中使用的细胞

[0054] 本发明可使用多种不同的细胞类型,特别是用作细胞疫苗的那些,其被基因工程改造以包括如本文所概述的许多组分。在一个实施方案中,所述方法提供了包含含有表达载体的组合物的细胞的用途,所述表达载体包含编码可分泌疫苗的核苷酸序列。在一些实施方案中,细胞包含含有表达载体的组合物,所述表达载体包含编码可分泌的gp96-Ig融合蛋白的核苷酸序列。在一些实施方案中,这种细胞被照射。在一些实施方案中,这种细胞是活的且减毒的。在各种实施方案中,这些细胞表达可由本发明方法的疫苗蛋白(例如,gp96)陪伴的肿瘤抗原。

[0055] 可以使用美国专利号8,685,384、8,475,785、8,968,720、9,238,064中描述的方法来产生编码gp96-Ig融合序列的核酸,所述专利均以引入的方式整体并入本文。

[0056] 在一些实施方案中,gp96-Ig融合物在载体上,诸如在哺乳动物表达载体上编码。

在一些实施方案中，gp96-Ig融合物是可分泌的gp96-Ig融合蛋白，其任选地缺少gp96 KDEL (SEQ ID NO:2)序列。编码Genbank登录号CAA33261的人gp96基因的示例性氨基酸序列：

[0057]
MRALWVLGLCCVLLTFGSVRADDEVDVDGTVEEDLGKSREGSRTDDEVVQ
REEEAIQLDGLNASQIRELREKSEKFAFQAEVNRMMKLIINSLYKNKEIFLRELI
SNASDALDKIRLISLTDENALSGNEELTVKIKCDKEKNLLHVTDTGVGMTREE
LVKNLGTIAKSGTSEFLNKMTEAQEDGQSTSELIGQFGVGFYSAFLVADKVIV
TSKHNNDTQHIWESDSNEFSVIADPRGNTLGRGTTITLVLKEEASDYLELDTI
KNLVKKYSQFINFPIYVWSSKTETVEEPMEEEEAAKEEKEESDDEAAVEEEEE
EKKPKTKKVEKTVWDWELMNDIKPIWQRPSKEVEEDEYKAFYKSFSKESDD
PMAYIHFTAEGEVTFKSILFVPTSAPRGLFDEYGSKKSDYIKLYVRRVFITDDF
HDMMPKYLNFVKGVVDSDDLPLNVSRETLQQHKLLKVIRKKLVRKTLDMIK
KIADDKYNDTFWKEFGTNIKLGVIEDHSNRTRLAKLLRFQSSHHPTDITSLDQ
YVERMKEKQDKIYFMAGSSRKEAESSPFVERLLKKGYEVIYLTEPVDEYCIQAL
PEFDGKRFQNVAKEGVKFDESEKTKESREAVEKEFEPLLNWMKDKALKDKIE
KAVVSQRLTESPCALVASQYGWSGNMERIMKAQAYQTGKDISTNYYASQK
KTFEINPRHPLIRDMLRRIKEDEDDKTVLDLAVVLFETATLRSGYLLPDTKAYG
DRIERMLRLSLNIDPDAKVEEEPEEEPEETAEDTTEDTEQDEDEEMDVGTDE
EEETAKESTAEKDEL (SEQ ID NO: 1)。

[0058] 在一些实施方案中，gp96-Ig融合物的gp96部分可包含全部或部分野生型gp96序列(例如，SEQ ID NO:1所示的人类序列)。例如，可分泌的gp96-Ig融合蛋白可以包含SEQ ID NO:1的前799个氨基酸，因此它缺乏C端KDEL(SEQ ID NO:2)序列。可替代地，与野生型gp96序列的前799个氨基酸相比，融合蛋白的gp96部分可以具有包含一个或多个取代、缺失或添加的氨基酸序列，使得它与野生型多肽具有至少为90％(例如，至少90％、至少91％、至少92％、至少93％、至少94％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％或至少99％)的序列同一性。因此，在一些实施方案中，编码gp96-Ig融合多肽的核酸的gp96部分可以编码在一个或多个氨基酸位置处与野生型gp96多肽不同的氨基酸序列，使得它包含一个或多个保守取代、非保守取代、剪接变体、同工型、其他种类的同系物和多态性。

[0059] 在某些实施方案中，gp96-Ig融合物中的Ig标签包含人IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgM、IgA或IgE的Fc区域，或其变体或片段。在一些实施方案中，表达载体包含DNA。在一些实施方案中，表达载体包含RNA。

[0060] 在一些实施方案中，细胞从正常或受影响的受试者(包括健康人、癌症患者和患有感染性疾病的患者)、私人实验室寄存所、公共培养物保藏(诸如美国典型培养物保藏)或从商业供应商获得。在一些实施方案中，细胞为人肿瘤细胞。在一些实施方案中，人肿瘤细胞是来自已确定的NSCLC、膀胱癌、黑素瘤、卵巢癌、肾细胞癌、前列腺癌、肉瘤、乳腺癌、鳞状细胞癌、头颈癌、肝细胞癌、胰腺癌或结肠癌细胞系的细胞。在一些实施方案中，人肿瘤细胞系为NSCLC细胞系。在一些实施方案中，人肿瘤细胞系为膀胱癌细胞系。

[0061] 在一些实施方案中，细胞表达修饰的且可分泌的热激蛋白(即，gp96-Ig)。在一些实施方案中，细胞表达可分泌的热激蛋白(即，gp96-Ig)，例如Viagenpumantucel-L。

Viagenpumatucel-L(HS-110)是专有的同种异体肿瘤细胞疫苗,其表达具有潜在抗肿瘤活性的热激蛋白gp96融合物(gp96-Ig)的重组分泌形式。在施用viagenpumatucel-L后,照射的活肿瘤细胞将gp96-Ig及其陪伴的肿瘤相关抗原(TAA)连续分泌到血流中,从而活化抗原呈递细胞、天然杀伤细胞并引发有效的细胞毒性T淋巴细胞(CTL),以应答内源性肿瘤细胞上的TAA。此外,Viagenpumatucel-L诱导可以抵抗复发性癌细胞的长寿的记忆T细胞。Viagenpumatucel-L在本领域中有时被称为"HS-110"。

[0062] 在一些实施方案中,细胞带有表达载体,所述表达载体包含编码可分泌的疫苗蛋白(即,gp96-Ig)的核苷酸序列。在一些实施方案中,细胞带有表达载体,所述表达载体包含编码可分泌的疫苗蛋白(即,gp96-Ig),例如Vesigenurtacel-L的核苷酸序列。Vesigenurtacel-L(HS-410)是专有的基于同种异体细胞的治疗性癌症疫苗,所述癌症疫苗表达热激蛋白gp96融合物(gp96-Ig)的重组分泌形式,其双重作用是作为抗原递送媒介物和佐剂。在施用后,Vesigenurtacel-L活化针对多种膀胱肿瘤抗原的CD8+T细胞反应,并诱导能够抵抗复发性癌细胞的记忆T细胞。Viagenpumatucel-L在本领域中有时被称为"HS-410"。

[0063] B.细胞生长

[0064] 可以照射细胞并将其悬浮在含有人血清白蛋白(HSA)的缓冲盐水中。为了避免可能的污染源,可以在无血清的确定成分培养基中培养细胞。可以将细胞储存在与冷冻保存剂相同的补充有20%二甲基亚砜作为冷冻保存剂的培养基中。

[0065] C.细胞配制

[0066] 如本领域中已知的,必须配制本发明的细胞以允许冷冻冻结和后续处理,包括照射。细胞制剂可在刺激对抗原的免疫反应的组合物中包含保持优选的pH范围的缓冲液、盐或将抗原呈递给个体的其他组分。可以将细胞悬浮在适当的生理溶液中,例如生理盐水或其他药理学可接受的溶剂或缓冲溶液中。本领域已知的缓冲溶液可以每1ml水含有0.05mg至0.15mg乙二胺四乙酸二钠、8.0mg至9.0mg NaCl、0.15mg至0.25mg聚山梨醇酯、0.25mg至0.30mg无水柠檬酸和0.45mg至0.55mg柠檬酸钠,以便实现约4.0至5.0的pH值。制剂还可以包含一种或多种药学上可接受的赋形剂。赋形剂是本领域中熟知的,包括缓冲液(例如柠檬酸盐缓冲液、磷酸盐缓冲液、乙酸盐缓冲液和碳酸氢盐缓冲液)、氨基酸、尿素、醇、抗坏血酸、磷脂、蛋白质(例如血清白蛋白)、EDTA、氯化钠、脂质体、甘露醇、山梨醇和甘油。

[0067] 生理上可接受的载剂还可以含有一种或多种增强对抗原的免疫应答的佐剂。药学上可接受的载剂包括例如药学上可接受的溶剂、助悬剂或用于将疫苗递送至受试者的任何其他药理学惰性的媒介物。典型药学上可接受的载剂包括但不限于:水、盐水溶液、粘合剂(例如聚乙烯吡咯烷酮或羟丙甲基纤维素);填充剂(例如乳糖或右旋糖和其他糖、明胶或硫酸钙)、润滑剂(例如淀粉、聚乙二醇或乙酸钠)、崩解剂(例如淀粉或羧甲淀粉钠)和润湿剂(例如月桂基硫酸钠)。

[0068] 在一些实施方案中,所述缓冲液为盐水溶液。在一些实施方案中,照射细胞并将其悬浮在含有0.5%HSA的缓冲盐水中。在一些实施方案中,缓冲液包含淀粉(例如喷他淀粉(pentastarch)),其为羟乙基淀粉的亚组,其中每11个羟基中具有五个羟乙基,使其具有约50%的羟乙基化。

[0069] 一般来讲,使用冷冻保存剂培养基,通常为1:1。在一些实施方案中,所述冷冻保存

培养基包含20x 10^6个细胞/mL、0.5％HSA、0.007％碳酸氢钠、0.567％氯化钠、5％DMSO和6％喷他淀粉。通过用冷冻保存培养基1:1稀释来新鲜配制细胞，以使药物最终浓度为20x10^6个活细胞/mL，其中含有6％喷他淀粉、5％DMSO、0.5％HSA、0.007％碳酸氢钠和0.567％氯化钠。

[0070] 在一些实施方案中，所述冷冻保存培养基包含2x 10^6个细胞/mL、0.5％HSA、0.007％碳酸氢钠，0.567％氯化钠、5％DMSO和6％喷他淀粉。将细胞以洗涤培养基(0.5％HSA、0.007％碳酸氢钠和0.9％氯化钠)新鲜稀释至4x10^6个细胞/mL的浓度，并立即通过用冷冻保存培养基1:1稀释来配制。

[0071] D.细胞等分

[0072] 一旦生长，通常将细胞等分到一次性小瓶中。将细胞手动分配到预先标记的1.2mL低温小瓶中。将低温小瓶保存在冰袋中，同时以30mL的增量分配以控制温度。将约1,000个低温小瓶(制造规模)填充到填充架中，并放入预冷却的聚碳酸酯低温箱中，直到填充完成。在一些实施方案中，细胞等分试样为10^5到10^7个，优选地是10^6个。

[0073] E.细胞冷冻

[0074] 一旦将细胞等分，就将其冷冻。在填充完成后，将低温箱在可控速率的冷冻器中冷冻，并在照射之前储存在液氮冷冻器的气相中。在此阶段，将小瓶取出以进行产品照射前表征和释放测试。

[0075] 将装有疫苗小瓶的低温箱(每个低温箱81个产品小瓶，每个LN2容器12个箱)从制造场所运送到LN2干燥托运器中进行照射。接收后，将低温箱转移到已用干冰预冷却的Styrofoam冷却器容器中(此干冰停留时间小于1小时)。将12个产品低温箱放置在使用三层的冷却器中，所述三层每层4个低温箱，每层由2.5英寸干冰隔开。将冷却器密封以进行照射。已全部确定了容器的规格、疫苗产品的储存箱的数量及其在容器中的取向、每个储存箱中的冷冻产品小瓶的数量以及容器中干冰的数量和位置，并将其写入标准操作程序。

[0076] 然后，在转盘上旋转时使用钴照射器(Co^{60})照射冷却器。根据描述照射日期可用的可用源衰减/辐射水平的算法，为了获得约120戈瑞的照射剂量，将小瓶照射约8至10分钟。

[0077] 递送至产品的实际剂量是基于照射当天的剂量率和暴露时间(在照射当天根据需要对源衰减进行调整)。在运送前，每批疫苗通过插入单个丙氨酸剂量计进行照射。该内部剂量计作为定性测试被独立读取，以确保进行辐射过程。在照射过程结束时，将低温箱放回LN2干燥托运器中，并运送回制造商。基于对通过在干冰上短暂停留的冷冻保存的真核细胞系稳定性的期望，对HS-410产品未重复适用性研究。但是，由于在照射后和解冻后对最终产品进行所有释放测试(支原体除外)，因此第2阶段产品的释放测试证实了干冰停留是否适合逐批用于HS-410产品。

[0078] F.细胞照射

[0079] 如本文所讨论，本发明涉及冷冻后细胞的照射。

[0080] 照射过程利用钴照射器(Co^{60})，以使细胞不能复制，但仍然能够产生gp96-Ig融合蛋白。配制最终产品，将其填充到单剂量小瓶中，并以未照射状态放置于低温储存中。仅在产品冷冻后才将其运送到单独的设施进行照射(将冷冻小瓶以LN2干燥托运器单元运送，然后转移到装有干冰的冷却器中进行照射过程本身)。照射过程的发展由如下所述的多个步骤组成。

[0081] G.照射的冷却器填充构造的定义

[0082] 图2示出了用于照射的冷却器填充构造。冷却器的构造是含有三层的Styrofoam箱，所述三层每层4个低温箱(总共12个低温箱，每个低温箱包含81个小瓶)，每层由2.5英寸的干冰隔开。冷却器包含972个低温小瓶(批次大小)。已确定了容器的规格、疫苗产品的储存箱的数量及其在容器中的取向、每个储存箱中的冷冻产品小瓶的数量以及容器中干冰的数量和位置，并将其写入标准操作程序。

[0083] H.照射设施处的运送和处理程序的验证

[0084] 为确保照射设施处的运送和处理程序不影响细胞活力也不英雄gp96-Ig表达，12个低温箱各自容纳两个未照射HS-110疫苗的冷冻小瓶(每个小瓶每0.6ml 12x 10^6个细胞)，其分别置于每个低温箱的内部或外部区域。每个低温箱的其余小瓶槽容纳冷冻保存培养基的冷冻小瓶。处理程序模拟了实际照射过程的步骤，并且包括将12个低温箱从运送的LN2杜瓦瓶中转移到冷却器中；将已填充的冷却器在室温下储存2小时，以模拟照射过程的更坏情况的持续时间；并且从冷却器转移回运送的LN2杜瓦瓶。模拟照射是在Steris照射设施上进行。在照射模拟之后，将低温箱转移回LN2运送杜瓦瓶中，并送回进行测试。测试了来自低温箱外部的12个小瓶和来自低温箱内部的12个小瓶的活力和gp96-Ig表达，并将其与使用未运送出来用于照射模拟并在制造场所保持的低温保存细胞生成的数据进行比较。放置在低温箱内部区域、低温箱外部区域或保持在制造场所的冷冻保存细胞之间没有观察到差异。这些数据表明，在不同场所照射细胞的运送和处理程序不会对疫苗细胞产生不利影响。

[0085] I.储存

[0086] 在运送后，将照射过的小瓶储存在液氮冷冻器的气相中，以便长期储存。

[0087] J.照射容器内的照射剂量分布

[0088] 进行剂量分布研究以确认可以将约120戈瑞(Gy)剂量递送到Styrofoam冷却器中容纳的12个低温箱内的不同位置。这是在室温下进行的，以克服剂量计在低于零温度下的校准问题。使用盐粒模拟干冰(因为盐粒的密度与干冰相似)。剂量计位于低温箱中的各个位置，并且在转盘上照射冷却器。将此重复三次，并且计算每个位置的平均照射剂量(%RSD～2.0%)。基于此构造，对于位于冷却器底层中心(最小照射)和顶层外角(最大照射)的小瓶，最小照射剂量率和最大照射剂量率根据与光源的距离分别计算为每分钟11.7和14.2戈瑞。为了获得约120戈瑞的照射剂量，应将小瓶照射8.5至10.3分钟，并在照射当天根据需要调整光源衰减。根据结果，在此过程中对于单个产品小瓶接受的预期照射范围为最小约108戈瑞至最大约132戈瑞(参见图3)。随着cGMP处理的发展，递送至产品的实际剂量是基于照射当天的剂量率和暴露时间。对于以后的产品批次，通过在运送前在每个疫苗批次中插入单一丙氨酸剂量计并且还通过在Styrofoam冷却器的相对角上放置至少2个剂量计来独立确认照射(以确认照射期间冷却器是否适当旋转)。在NIST时读取这些剂量计以确保进行照射过程并评估接受的照射剂量。

[0089] K.给药

[0090] 许多常用的剂量测量或剂量测定方法受温度影响，因此无法将剂量计放置在冷冻物料的体积中。使用参考剂量计监测位置以及凭经验确定的校正因子，就无需补偿由温度引起的剂量计响应差异。模拟材料模拟在环境温度下所提出的主题材料或不会向市场销售

的实际材料的密度和分布，所述模拟材料可以用来确定剂量比(以及所产生的校正因子)，从而避免温度损害剂量计结果。一旦在环境温度下使用代表性材料确定比率，就可以使用常规的剂量测定系统来测量参考剂量。然后，可以通过将既定校正因子应用于所测量的参考剂量来计算最小剂量和最大剂量。当需要递送至产品的剂量范围低于在照射时使用的剂量系统的测量能力时，可以在处理期间使用剂量率代替剂量计。可以基于暴露时间、在相同处理条件下进行的三次照射运行内赋予的平均最小递送剂量和平均最大剂量来确定产品的最小剂量率和最大剂量率，并针对放射性源的衰减进行调整。所计算的最小剂量率和最大剂量率对于转盘和计算它们时的位置为特定的。一旦计算，所述剂量率可用于确定照射处理时间和照射期间递送的剂量。

[0091] 在一些实施方案中，剂量率为约0.1(Gy)、0.2(Gy)、0.3(Gy)、0.4(Gy)、0.5(Gy)、0.6(Gy)、0.7(Gy)、0.8(Gy)、0.9(Gy)、1(Gy)、5(Gy)、10(Gy)、15(Gy)、20(Gy)、25(Gy)、30(Gy)、35(Gy)、40(Gy)、45(Gy)、50(Gy)、55(Gy)、60(Gy)、65(Gy)、70(Gy)、75(Gy)、80(Gy)、85(Gy)、90(Gy)、95(Gy)、100(Gy)、110(Gy)、115(Gy)、120(Gy)、125(Gy)、130(Gy)、135(Gy)、140(Gy)、145(Gy)、150(Gy)、155(Gy)、160(Gy)、165(Gy)、170(Gy)、175(Gy)、180(Gy)、185(Gy)、190(Gy)、195(Gy)、200(Gy)、210(Gy)、215(Gy)、220(Gy)、225(Gy)、230(Gy)、235(Gy)、240(Gy)、245(Gy)、250(Gy)、255(Gy)、260(Gy)、265(Gy)、270(Gy)、275(Gy)、280(Gy)、285(Gy)、290(Gy)、295(Gy)、300(Gy)、320(Gy)、325(Gy)、330(Gy)、35(Gy)、340(Gy)、350(Gy)、360(Gy)、365(Gy)、370(Gy)、375(Gy)、380(Gy)、385(Gy)、390(Gy)、400(Gy)、425(Gy)、430(Gy)、435(Gy)、440(Gy)、445(Gy)、450(Gy)、460(Gy)、465(Gy)、470(Gy)、475(Gy)、480(Gy)、485(Gy)、490(Gy)、495(Gy)、500(Gy)、525(Gy)、530(Gy)、535(Gy)、540(Gy)、545(Gy)、550(Gy)、560(Gy)、565(Gy)、570(Gy)、575(Gy)、580(Gy)、585(Gy)、590(Gy)、595(Gy)、600(Gy)、625(Gy)、630(Gy)、635(Gy)、640(Gy)、645(Gy)、650(Gy)、660(Gy)、665(Gy)、670(Gy)、675(Gy)、680(Gy)、685(Gy)、690(Gy)、695(Gy)、700(Gy)、725(Gy)、730(Gy)、735(Gy)、740(Gy)、745(Gy)、750(Gy)、755(Gy)、760(Gy)、765(Gy)、775(Gy)、780(Gy)、785(Gy)、790(Gy)、795(Gy)、800(Gy)、825(Gy)、830(Gy)、835(Gy)、840(Gy)、845(Gy)、850(Gy)、855(Gy)、860(Gy)、865(Gy)、870(Gy)、875(Gy)、880(Gy)、885(Gy)、890(Gy)、900(Gy)、925(Gy)、930(Gy)、935(Gy)、940(Gy)、945(Gy)、950(Gy)、955(Gy)、960(Gy)、965(Gy)、970(Gy)、975(Gy)、980(Gy)、985(Gy)、995(Gy)或1,000(Gy)，包括端点。

[0092] 在一些实施方案中，剂量率为约20(Gy)、25(Gy)、30(Gy)、35(Gy)、40(Gy)、45(Gy)、50(Gy)、55(Gy)、60(Gy)、65(Gy)、70(Gy)、75(Gy)、80(Gy)、85(Gy)、90(Gy)、95(Gy)、100(Gy)、110(Gy)、115(Gy)、120(Gy)、125(Gy)、130(Gy)、135(Gy)、140(Gy)、145(Gy)、150(Gy)、155(Gy)、160(Gy)、165(Gy)、170(Gy)、175(Gy)、180(Gy)、185(Gy)、190(Gy)、195(Gy)、200(Gy)、210(Gy)、215(Gy)、220(Gy)、225(Gy)、230(Gy)、235(Gy)、240(Gy)、245(Gy)、250(Gy)、255(Gy)、260(Gy)、265(Gy)、270(Gy)、275(Gy)、280(Gy)、285(Gy)、290(Gy)、295(Gy)、300(Gy)、320(Gy)、325(Gy)、330(Gy)、35(Gy)、340(Gy)、350(Gy)、360(Gy)、365(Gy)、370(Gy)、375(Gy)、380(Gy)、385(Gy)、390(Gy)、400(Gy)、425(Gy)、430(Gy)、435(Gy)、440(Gy)、445(Gy)、450(Gy)、460(Gy)、465(Gy)、470(Gy)、475(Gy)、480(Gy)、485(Gy)、490(Gy)、495(Gy)、500(Gy)，包括端点。在一些实施方案中，剂量率为120(Gy)。在一些实施方案中，在干冰上用120(Gy)照射小瓶中等分且冷冻保存的癌症疫苗细胞。

[0093] 在一些实施方案中，剂量率为约0.1(kGy)、0.2(kGy)、0.3(kGy)、0.4(kGy)、0.5(kGy)、0.6(kGy)、0.7(kGy)、0.8(kGy)、0.9(kGy)、1(kGy)、25(kGy)、50(kGy)、75(kGy)、100(kGy)、125(kGy)、150(kGy)、175(kGy)、200(kGy)、225(kGy)、250(kGy)、275(kGy)、300(kGy)、325(kGy)、350(kGy)、375(kGy)、400(kGy)、425(kGy)、450(kGy)、475(kGy)、500(kGy)、525(kGy)、550(kGy)、575(kGy)、600(kGy)、625(kGy)、650(kGy)、675(kGy)、700(kGy)、725(kGy)、750(kGy)、775(kGy)、800(kGy)、825(kGy)、850(kGy)、875(kGy)、900(kGy)、925(kGy)、950(kGy)、975(kGy)或1,000(kGy)，包括端点。

[0094] 在一些实施方案中，将细胞照射约1至2分钟、2至3分钟、3至4分钟、4至5分钟、5至6分钟、6至7分钟、7至8分钟、8至9分钟、9至10分钟、10至11分钟、11至12分钟、12至13分钟、13至14分钟、14至15分钟、15至16分钟、16至17分钟、17至18分钟、18至19分钟、19至20分钟、20至21分钟、21至22分钟、22至23分钟、23至24分钟、24至25分钟、25至26分钟、26至27分钟、27至28分钟、28至29分钟、29至20分钟，包括端点。

[0095] 在一些实施方案中，将细胞照射约8.5至10.3分钟。

[0096] 如本文所用，“参考剂量位置”是指相对于最大或最小吸收剂量位置具有可再现和记录的关系的位置。

[0097] 剂量均匀度(DUR)是指处理负载内最大吸收剂量与最小吸收剂量的比率。所述概念也称为最大/最小剂量比率。在一些实施方案中，内部剂量均匀度(DUR)被计算为1.18，DUR＝最大剂量/最小剂量＝2.91/2.45＝1.18。在一些实施方案中，最小内部剂量(所有三次运行的平均值)位于位置9B处(2.45kGy)，其位于托运器冷却器的近似几何中心的小瓶的底层下方。在一些实施方案中，最大内部剂量(所有三次运行的平均值)位于位置1T处(2.91kGy)，其位于托运器外角的箱中间层内部的小瓶上方。

[0098] 在一些实施方案中，如下计算所实现的最小剂量率和最大剂量率：在研究期间所有三次照射运行的暴露时间为233分钟。在一些实施方案中，为了计算确保在照射期间实现最小剂量所需的最小暴露时间，最小暴露时间＝照射当天的目标剂量/最小剂量率。在一些实施方案中，为了计算确保在照射期间不超过最大剂量所需的最大暴露时间，最大暴露时间＝照射当天的目标剂量/最大剂量率。在一些实施方案中，为了确保在不超过最大所需剂量的情况下实现最小所需剂量，将平均暴露时间计算为(最小暴露时间+最大暴露时间)/2。在一些实施方案中，在照射之后，将最小递送剂量确定为：最小递送剂量＝暴露时间*最小剂量率。在一些实施方案中，在照射之后，将最大递送剂量确定为：最大递送剂量＝暴露时间*最大剂量率

[0099] 为了在使用参考剂量测定法时能够最准确地描述内部递送剂量并确保在不超过最大既定剂量的情况下实现产品的最小剂量，必须计算从最小位置和最大位置到每个参考剂量计的剂量调节比。在这些剂量调节比中，选择最高参考值与最小值比率和最低参考值与最大值比率，并将其用于后续计算中。

[0100] 在一些实施方案中，使用参考位置FC(前中心)和RC(后中心)。在一些实施方案中，计算位置FC处的总平均剂量并将其确定为3.04kGy。在一些实施方案中，计算所有三次运行在位置RC的总平均剂量，并将其确定为3.03kGy。在一些实施方案中，针对每个参考位置计算从参考位置到最小内部递送剂量以及从参考位置到最大内部递送剂量的剂量调节比。将从FC位置到最小内部递送剂量的剂量调节比计算为平均FC剂量/平均最小剂量＝3.04/

2.45＝1.239。将从FC位置到最大内部递送剂量的剂量调节比计算为平均FC剂量/平均最大剂量＝3.04/2.91＝1.046。将从RC位置到最小内部递送剂量的剂量调节比计算为平均RC剂量/平均最小剂量＝3.03/2.45＝1.235。将从RC位置到最大内部递送剂量的剂量调节比计算为平均RC剂量/平均最大剂量＝3.03/2.91＝1.042。

[0101] 在一些实施方案中，为了确定递送至参考剂量计的剂量范围，通过将由两个参考值中的最高值确定的所需最小内部剂量乘以最小比率来确定参考剂量计的最小目标剂量(例如，所需最小内部剂量*1.239＝最小参考剂量)。在一些实施方案中，通过乘以确定的所需最大内部剂量乘来确定参考剂量计的最大目标剂量。(例如，所需最大内部剂量*1.042＝最大参考剂量)。如果在常规生产期间使用参考剂量测定法，则为了由参考剂量确定内部递送剂量，将最小参考剂量除以1.239(例如，参考剂量/1.239＝最小内部剂量)。通过将最大参考剂量除以1.042来确定最大内部参考剂量(例如，参考剂量/1.239＝最大内部剂量)。

[0102] L.处理参数

[0103] 如本文所用，“模拟或替代材料”是指具有与正测试的实际材料相似的特性且可以代替实际产品或不会投放市场的实际产品来使用的材料。在一些实施方案中，小瓶构造被布置成9行，每行各9个，共81个小瓶，每个小瓶包含0.6mL冷冻保存的细胞。不包括部分小瓶箱，而用0.6mL替代产品填充。输入要照射的冷却器数量(每3个杜瓦瓶中有一个)作为箱子数量。产品所需的剂量范围以kGy输入到剂量范围。

[0104] M.照射冷却器的预冷却

[0105] 在一些实施方案中，照射冷却器的一个平面根据方案被标记为“前面”。使用两个纸板分离器，并将冷却器冷却至少30分钟。在一些实施方案中，将两层和半层(21/2)干冰置于照射冷却器的底部，并用一个准备好的纸板分离器覆盖并盖上盖子。在更换照射冷却器盖时，记录、签字并注明日期。

[0106] N.小瓶箱的转移

[0107] 在某些实施方案中，转移必须在五(5)分钟内完成。在一些实施方案中，转移必须在添加干冰之后至少30分钟开始。在一些实施方案中，当需要每个杜瓦瓶时，以数字顺序打开杜瓦瓶。在一些实施方案中，所有的小瓶箱都以标签朝向照射冷却器的“后面”定向。从杜瓦瓶取出架是按数字顺序进行的。照射冷却器中的小瓶箱放置在纸板分离器的顶部。记录将第一个小瓶箱放置在照射冷却器中的时间(小时和分钟)。在杜瓦瓶中更换架，并封闭杜瓦瓶。将第二个准备好的纸板分离器放在小瓶箱的顶部，并用干冰覆盖。将照射冷却器接收到ODMS-RT系统中。将要求的最小剂量输入为0.00kGy并且将要求的最大剂量输入为0.01。

[0108] O.照射暴露时间的计算

[0109] 在一些实施方案中，将冷冻保存的细胞的照射日期输入到剂量率图表。在一些实施方案中，将最小暴露时间计算为:要求的最小剂量(Gy)÷最小剂量率(Gy/分钟)＝暴露时间(分钟)。在一些实施方案中，将最大暴露时间计算为:要求的最大剂量(Gy)÷最大剂量率(Gy/分钟)＝暴露时间(分钟)。在一些实施方案中，将平均暴露时间计算为:(最小暴露时间+最大暴露时间)/2＝平均暴露时间。暴露时间必须以分和秒为单位输入到处理计时器中。为此，必须将平均暴露时间的剩余分钟数(小数)如下转换为秒数:[15.11.6]的任何剩余分钟数(小数位)x 60秒/分钟＝秒。向照射冷却器的底部朝下照射，因此箭头指向上方，并且在照射期间不会重新定向。

[0110] P.照射后

[0111] 在一些实施方案中,转移在5分钟内完成。将最后小瓶箱从冷却器转移至杜瓦瓶的时间不超过从将第一个小瓶箱放入冷却器后的两个小时。在每个杜瓦瓶中,将“照射”标签折成两半,放在架的柄部周围,使两端彼此粘在一起。将标签的两端装订在一起。打开冷却器,并除去冰顶层和顶部纸板分离器。第一位技术人员打开杜瓦瓶3,然后将架卸下。第二位技术人员一次移出一个小瓶箱的顶层,然后将其交给第一位技术人员。记录从照射冷却器中移出第一个小瓶箱的时间(小时和分钟)。负责将小瓶箱转移到杜瓦瓶中并记录时间的技术人员将签名并注明日期。记录从将第一个小瓶箱放入冷却器中到完成将最后一个小瓶箱从冷却器转移到杜瓦瓶所用的总时间。

[0112] Q.例示性实施方案

[0113] 在一些实施方案中,细胞表达修饰的且可分泌的热激蛋白(即,gp96-Ig)。在一些实施方案中,细胞表达可分泌的热激蛋白(即,gp96-Ig),例如Viagenpumantucel-L。

[0114] 在一些实施方案中,细胞带有表达载体,所述表达载体包含编码可分泌的疫苗蛋白(即,gp96-Ig)的核苷酸序列。在一些实施方案中,细胞带有表达载体,所述表达载体包含编码可分泌的疫苗蛋白(即,gp96-Ig),例如Vesigenurtacel-L的核苷酸序列。

[0115] 在一些实施方案中,将细胞配制在含有盐水溶液的缓冲液中。在一些实施方案中,照射细胞并将其悬浮在含有0.5%HSA的缓冲盐水溶液中。在一些实施方案中,所述缓冲液在约50℃下含有pH 7.5的20mM磷酸钠缓冲液、0.5M NaCl、3nM MgCl2。在一些实施方案中,所述缓冲液在37℃下含有100mL体积的pH 7.5的20mM磷酸钠缓冲液、0.5M NaCl、3mM MgCl2和1mM ADP。

[0116] 在一些实施方案中,将细胞配制在冷冻保存剂培养基中。在一些实施方案中,将细胞以1:1的稀释比率配制在冷冻保存剂培养基中。在一些实施方案中,所述冷冻保存培养基包含20x 10^6个细胞/mL、0.5%HSA、0.007%碳酸氢钠,0.567%氯化钠、5%DMSO和6%喷他淀粉。通过用冷冻保存培养基1:1稀释来新鲜配制细胞,以使最终浓度为20x10^6个活细胞/mL,其中含有6%喷他淀粉、5%DMSO、0.5%HSA、0.007%碳酸氢钠和0.567%氯化钠。

[0117] 在一些实施方案中,使用钴照射器(Co^{60})照射配制的细胞。在一些实施方案中,以约1(Gy)、5(Gy)、10(Gy)、20(Gy)、30(Gy)、40(Gy)、50(Gy)、60(Gy)、70(Gy)、80(Gy)、90(Gy)、100(Gy)、110(Gy)或120(Gy)(包括端点)的剂量照射细胞。在一些实施方案中,剂量率为120(Gy)。在一些实施方案中,在干冰上用120(Gy)照射小瓶中等分且冷冻保存的癌症疫苗细胞。在一些实施方案中,将细胞照射约1至2分钟、2至3分钟、3至4分钟、4至5分钟、5至6分钟、6至7分钟、7至8分钟、8至9分钟、9至10分钟,包括端点。在一些实施方案中,将细胞照射约8.5至10.3分钟。

[0118] 在一些实施方案中,所述冷冻保存培养基包含2x 10^6个细胞/mL、0.5%HSA、0.007%碳酸氢钠,0.567%氯化钠、5%DMSO和6%喷他淀粉。将细胞以洗涤培养基(0.5%HSA、0.007%碳酸氢钠和0.9%氯化钠)新鲜稀释至4x10^6个细胞/mL的浓度,并立即通过用冷冻保存培养基的1:1稀释比率来配制。在一些实施方案中,使用钴照射器(Co^{60})照射配制的细胞。

[0119] 在一些实施方案中,以约20(Gy)、25(Gy)、30(Gy)、35(Gy)、40(Gy)、45(Gy)、50(Gy)、55(Gy)、60(Gy)、65(Gy)、70(Gy)、75(Gy)、80(Gy)、85(Gy)、90(Gy)、95(Gy)、100(Gy)、

110(Gy)、115(Gy)、120(Gy)、125(Gy)、130(Gy)、135(Gy)、140(Gy)、145(Gy)、150(Gy)、155(Gy)、160(Gy)、165(Gy)、170(Gy)、175(Gy)、180(Gy)、185(Gy)、190(Gy)、195(Gy)、200(Gy)、210(Gy)、215(Gy)、220(Gy)、225(Gy)、230(Gy)、235(Gy)、240(Gy)、245(Gy)、250(Gy)、255(Gy)、260(Gy)、265(Gy)、270(Gy)、275(Gy)、280(Gy)、285(Gy)、290(Gy)、295(Gy)、300(Gy)、320(Gy)、325(Gy)、330(Gy)、35(Gy)、340(Gy)、350(Gy)、360(Gy)、365(Gy)、370(Gy)、375(Gy)、380(Gy)、385(Gy)、390(Gy)、400(Gy)、425(Gy)、430(Gy)、435(Gy)、440(Gy)、445(Gy)、450(Gy)、460(Gy)、465(Gy)、470(Gy)、475(Gy)、480(Gy)、485(Gy)、490(Gy)、495(Gy)、500(Gy)(包括端点)的剂量照射细胞。在一些实施方案中,剂量率为120(Gy)。在一些实施方案中,在干冰上用120(Gy)照射小瓶中等分且冷冻保存的癌症疫苗细胞。在一些实施方案中,将细胞照射约1至2分钟、2至3分钟、3至4分钟、4至5分钟、5至6分钟、6至7分钟、7至8分钟、8至9分钟、9至10分钟,包括端点。在一些实施方案中,将细胞照射约8.5至10.3分钟。

[0120] 为了与HS-410一起使用,将细胞以1:1稀释比率配制在冷冻保存剂培养基中。在一些实施方案中,所述冷冻保存培养基包含20x 10^6个细胞/mL、0.5%HSA、0.007%碳酸氢钠,0.567%氯化钠、5%DMSO和6%喷他淀粉。通过用冷冻保存培养基1:1稀释来新鲜配制细胞,以使最终浓度为20x10^6个活细胞/mL,其中含有6%喷他淀粉、5%DMSO、0.5%HSA、0.007%碳酸氢钠和0.567%氯化钠。在一些实施方案中,使用钴照射器照射配制的细胞。在一些实施方案中,在干冰上用120(Gy)照射小瓶中等分且冷冻保存的细胞。在一些实施方案中,将细胞照射约8.5至10.3分钟。

[0121] 为了与HS-110一起使用,将细胞以1:1的稀释比率配制在冷冻保存剂培养基中。在一些实施方案中,所述冷冻保存培养基包含20x10^6个细胞/mL、0.5%HSA、0.007%碳酸氢钠,0.567%氯化钠、5%DMSO和6%喷他淀粉。通过用冷冻保存培养基1:1稀释来新鲜配制细胞,以使最终浓度为20x10^6个活细胞/mL,其中含有6%喷他淀粉、5%DMSO、0.5%HSA、0.007%碳酸氢钠和0.567%氯化钠。在一些实施方案中,使用钴照射器照射配制的细胞。在一些实施方案中,在干冰上用120(Gy)照射小瓶中等分且冷冻保存的细胞。在一些实施方案中,将细胞照射约8.5至10.3分钟。

[0122] 1.细胞功能测定

[0123] 令人惊讶地是,在照射之前冷冻细胞疫苗细胞通常不会改变其特性,并提供了显著的益处。如下所述,通常使用一种或多种测定法检查这些属性以确定细胞活力、复制能力和代谢功能。

[0124] a.细胞活力测定

[0125] 在一个实施方案中,进行细胞活力测定。在一些实施方案中,使用CellTrace™Violet细胞增殖试剂盒来获得细胞活力。CellTrace™ Violet染料穿过质膜并与细胞内部共价结合,其中荧光染料在细胞培养环境中连续几天提供一致的信号。所述染料与细胞表面和内部的所有游离胺共价结合,几乎没有细胞毒性,对细胞的增殖能力或生物学影响很小。对于复制和分裂的细胞,每个细胞中的染料浓度会在每次分裂时被稀释。不生长的细胞不会显示相同的染料稀释度。因此,当膜染料在分裂的亲代细胞和两个所得子细胞之间被近似均等地稀释时,可以基于荧光减弱来区分两个群体。

[0126] 在一些实施方案中,使用氚化的(^{3}H)-胸腺嘧啶核苷掺入方法来获得细胞活力。胸腺嘧啶核苷掺入测定利用一种策略,其中在有丝分裂细胞分裂期间将放射性核苷^{3}H-胸腺

嘧啶核苷掺入染色体DNA的新链中。闪烁β计数器用于测量从细胞中回收的DNA的放射性，以便确定响应于受试物而发生的细胞分裂程度。

[0127] b.复制能力测定

[0128] 在一个实施方案中，进行复制能力测定。如本文所述，用作疫苗的细胞组合物通常不能复制，尽管它们将保持存活一段时间。

[0129] 在一些实施方案中，使用克隆形成测定(CFU)测定法来确认新照射过程使细胞无法复制。在此CFU测试中，培养底物是制造过程中用于扩增细胞的组织处理过的聚苯乙烯上的相同类型的单层培养物。此CFU测定在培养21天后检查了照射的细胞(和适当的对照)中复制细胞的集落。

[0130] c.代谢功能测定

[0131] 在一个实施方案中，进行代谢功能测定。在一些实施方案中，代谢功能测定通过以下来指示培养物中的细胞是否存活：评估代谢率；评估好氧(氧化磷酸化)与厌氧(糖酵解)过程对于产生ATP的相对贡献；测量微孔板中的粘附细胞；或测量微孔板中的悬浮细胞。

[0132] 实施例

[0133] 在为了使本文公开的发明可以更有效地理解，提供了以下实施例。应理解，这些实施例仅出于说明性目的且不应解释为以任何方式限制本发明。

[0134] 实施例1：制造过程和过程控制。

[0135] Vesigenurtacel-L(HS-410)药物产品的制造过程由五个步骤组成：配制、小瓶填充、冷冻、照射和储存(参见图1)。原料药(vesigenurtacel-L细胞的散装收获物(bulk harvest))没有储存，而是立即以所需浓度重悬浮于最终的冷冻保存培养基中，并分散到单剂量低温小瓶中以实现所需剂量水平。然后将小瓶以受控的速率冷冻，并在照射之前储存在液氮冷冻器的蒸气中。照射的小瓶构成最终的药物产品。所有细胞培养和扩增的开放式操作均在无菌条件下，在ISO 7类的ISO 5类生物安全柜(BSC)中进行。

[0136] 配制(开放系统)

[0137] 原料药(40x 10^6个细胞/mL)并不储存，而是立即进行处理以生成药物产品。对于高强度制剂(高剂量)，通过用冷冻保存培养基1:1稀释来新鲜配制原料药细胞，以使药物最终浓度为20x 10^6个活细胞/mL，其中含有6％喷他淀粉、5％DMSO、0.5％HSA、0.007％碳酸氢钠和0.567％氯化钠。

[0138] 对于低强度制剂(低剂量)，将原料药在洗涤培养基(0.5％HSA、0.007％碳酸氢钠和0.9％氯化钠)中新鲜稀释至4x 10^6个细胞/mL的浓度，并立即通过用冷冻保存培养基1:1稀释来配制，使最终药物浓度为2x10^6个活细胞/mL，其中含有6％喷他淀粉、5％DMSO、0.5％HSA、0.007％碳酸氢钠和0.567％氯化钠。

[0139] CellTrace Violet测定

[0140] 为了评估细胞活力，使用CellTrace™Violet细胞增殖试剂盒。CellTrace™Violet染料穿过质膜并与细胞内部共价结合，其中荧光染料在细胞培养环境中连续几天提供一致的信号。所述染料与细胞表面和内部的所有游离胺共价结合，几乎没有细胞毒性，对细胞的增殖能力或生物学影响很小。对于复制和分裂的细胞，每个细胞中的染料浓度会在每次分裂时被稀释。不生长的细胞不会显示相同的染料稀释度。因此，当膜染料在分裂的亲代细胞和两个所得子细胞之间被近似均等地稀释时，可以基于荧光减弱来区分两个群体。

[0141] 为了评估在第2阶段制造过程中进行的照射过程,使用CTV测定评估在此过程下制造的首批GMP批次(高剂量批次和低剂量批次,140171149-HD和140171149-LD)。在这些第2阶段过程中,根据既定标准操作规范(SOP)对这些批次进行照射。对于CTV测定,从不同的层、箱和小瓶位置(包括最低照射小瓶)选择了20x高剂量HS-410小瓶(每0.6mL 12x 10^6个细胞)和10x低剂量(每0.6mL 1.2x 10^6个细胞)。图4示出了对于每个箱层(T、M和B)以及两个批次(高剂量和低剂量)所测试的小瓶的相对位置。结果表明,对于HS-410细胞,CTV测定足够灵敏,可以在1000个非复制细胞的背景中检测到1个能够复制的细胞。对于这种细胞系,CTV测定的灵敏度水平与使用氚化(^{3}H)-胸腺嘧啶核苷掺入法所观察到的灵敏度水平相似(参见图4)。

[0142] 照射过程的表征

[0143] 通过两种完全不同的测试方法测试第一批HS-410GMP批次(高剂量和低剂量)的低温小瓶中的复制能力:CellTrace Violet染色(CTV测定)和检查组织培养物处理的聚苯乙烯上的单层培养物的克隆形成测定(CFU测定)。使用这些测定而不是氚化胸腺嘧啶核苷掺入,因为CTV测定和CFU测定各自专门评估细胞复制,而氚化胸腺嘧啶核苷评估检测DNA修复活性以及实际复制。在制造HS-410产品时,在照射过程之后,预期细胞会遭受DNA损伤,但仍保持活力和代谢活性,因此,预期细胞可能会尝试DNA修复,但最终细胞将无法复制。软琼脂测试被认为是评估这些细胞的复制能力的一种可能的测试方法。但是,用软琼脂对这些细胞进行测试表明,HS-410细胞系相对依附依赖性,在软琼脂中不能很好地生长。因此,软琼脂不可能成为用于检测HS-410产品中能够复制的细胞的灵敏测定方法。

[0144] CTV复制能力测定表明,来自两个测试批次(低剂量批次和高剂量批次)的所有小瓶都不能复制,这与未暴露于照射下的细胞形成强烈对比。图5中示出的数据代表了使用来自所有测试小瓶的细胞获得的CTV数据。复制能力测定(CellTrace™ Violet(CTV)阳性)符合测试对照和有效性标准。在此测定中,与培养7天后的对照复制HS-410细胞群体相比,非复制细胞群体中存在的>90%(最低CTV+LD&HD=94.3%,平均CTV+HD=97.7%,平均CTV+HD=98.6%)的CTV染料符合规范,所有测试的照射的细胞冷冻管均证明不具有复制能力。另外,在第7天进行细胞计数(将活细胞和死细胞合并),也表明缺乏复制。在第0天接种525,000个照射的细胞,第7天HD和LD小瓶的平均细胞数分别为487,816和507,430个细胞,表明缺乏细胞生长。(由于技术原因,将用于此测定的细胞总共培养7天。在更长的培养时间之后,对这些细胞进行FACS检测是不可行的,因为照射的细胞会扩大到无法进行FACS检测的大小。)

[0145] 克隆形成测定(单层培养)

[0146] 为了为CTV测定提供额外的支持,使用第二种测定方法确认新的照射过程使HS-410细胞无法复制。在此CFU测试中,培养底物是制造过程中用于细胞扩增的组织处理过的聚苯乙烯上的相同类型的单层培养物。此CFU测定在培养21天后检查了照射的HS-410细胞(和适当的对照)的复制细胞的集落。设计此测定的条件以符合FDA的建议。为了对在第2阶段过程中生产的初始GMP批次进行CFU测试,从每批次五个不同箱中选择了五个高剂量HS-410小瓶(每0.6mL1(12x 10^6个细胞)和五个低剂量(每0.6mL 1.2x1 0^6个细胞),每个批次中的四个小瓶代表最低照射剂量的小瓶,并且每批次一个小瓶代表接受最高照射水平的位置。图6示出了对于每个箱层(T、M和B)和两个批次(高剂量和低剂量)所测试的小瓶的相对

位置。

[0147] CFU测定表明,来自两个测试批次(低剂量和高剂量批次)的所有小瓶都不能复制,这与未暴露于照射下的细胞形成强烈对比。测定的对照(将少量未照射的细胞掺入大量照射的细胞中,之后接种混合物)表明,在用于这些培养的接种密度下,测定灵敏度为至少1/300,000(所述测定足够灵敏,可以在300,000多个无法复制的照射细胞的背景中检测到一个能够复制的细胞)。进行CFU测定,将每批五个产品瓶的全部内容物接种(如以上图6所示选择的小瓶,在独立实验室中也使用了相同的测定方法,检查了此批次中较少数量的细胞。来自独立实验室的结果还表明,使用此CFU方法无法检测到能够复制的细胞(参见图7)。

[0148] 实施例2:照射过程验证

[0149] 照射可行性研究

[0150] 在已证明在不同设施照射细胞的运送和处理程序不会影响活力或gp96-Ig表达并且可以将目标照射剂量递送至Styrofoam冷却器的所有区域后,进行了一项试验性照射研究。与模拟照射研究相似,12个低温箱各自包含两个HS-110疫苗的冷冻小瓶(每个小瓶每0.6mL12x 10^6个细胞),其放置在低温箱的外部或内部。每个低温箱的其余小瓶槽中都容纳冷冻保存剂培养基的冷冻小瓶。按照既定标准操作规范(SOP),运送并照射这些细胞。然后将照射的小瓶以LN2杜瓦瓶运送回制造厂,并测试细胞的活力、HLA A1和gp96-Ig表达以及复制能力。对3个照射前和照射后的3个小瓶进行每种测定。此外,还测试了含有冷冻保存培养基的小瓶的容器密闭性完整性(染料浸入测试)。如下表3所示,在照射前和照射后的样品之间未观察到活力、活细胞的回收率、HLA A1或gp96-Ig表达的差异。另外,如通过剂量分布研究所确定,在预期将接受最大、最小或中等照射剂量的细胞小瓶之间未观察到差异(参见图8)。

[0151] 表1.照射后的活力、回收率以及HLA A1和gp96-Ig表达

[0152]

样品	%活力(1)	%活细胞回收率(1)	HLA A1 (阳性%)(1)	gp96-Ig (ng/10^6 细胞)(1)
照射前(P)	96.7	86.2	96.8	48
低剂量(L)	96.2	91.8	96.6	41
中剂量	95.4	87.8	96.8	45
高剂量(H)	96.2	90.9	97.2	49

[0153] (1)平均3个小瓶

[0154] 照射过程验证

[0155] 为了通过证明被照射的测试物品没有复制能力来验证照射过程,根据既定SOP,发送12个低温箱各自中包含冷冻HS-110疫苗(每0.6mL 12x 10^6个细胞)的低温小瓶以进行照射。从10个低温箱各自的外部和内部选择40个疫苗小瓶以进行复制能力测定测试。基于USP<71>中用于评估无菌性的采样模型,此数字是代表整个批次的统计上适当的样品数目。

[0156] 简言之,将照射、未照射和丝裂霉素C(MMC)处理的细胞解冻,并置于培养物中过夜以回收。第二天,将细胞在PBS中洗涤一次并通过胰蛋白酶消化收获。使用血细胞计数器对细胞计数,并以106个细胞/mL重悬于PBS中。将DMSO添加到CellTrace Violet的小瓶中,使最终浓度为5mM,并且然后将其添加到细胞中,以使最终浓度为10μM。将细胞在黑暗中于37C孵育20分钟,此时通过添加2-5体积的含有10%FBS(CM1)的IMDM来淬灭未偶联的染料。移出

$5x10^5$-1x 10^6个细胞，将其离心分离，并重悬于PBS中以进行流式细胞术分析。将照射且MMC处理的细胞以3x 10^3个细胞/mL接种在含有40mL CM1的T175烧瓶中。将未照射的细胞以3x 10^3个细胞/mL接种在含有25mL CM1的T75烧瓶中。将细胞在37C和5％CO_2下孵育7天，然后通过胰蛋白酶消化并通过流式细胞仪进行分析。设置闸控使得在第7天约95％未照射对照细胞是在CTV群体中。如果在第7天照射的测试样品>90％CTV+，则认为它们不能复制。

[0157] 通过在初始标记后7天收获细胞来制备测试制品。收集用过的培养基；用PBS洗涤细胞，并通过胰蛋白酶消化从烧瓶中释放。使用用过的培养基中和胰蛋白酶，并在中和后用PBS洗涤所有烧瓶一次。将所有洗涤液与用过的培养基和中和的胰蛋白酶合并，以尽可能收获最大百分比的细胞。在此测定中使用两个对照。将未照射的HS-110细胞用作增殖对照，并且将MMC处理的HS-110细胞用作非增殖对照。如果第0天所有样品均显示相似的标记水平，并且在第7天有可用于收获的细胞，则认为测定为有效。

[0158] 测试结果的评估包括比较第0天和第7天的荧光水平，从而可以确定细胞是否正在主动复制。主动分裂的细胞比不分裂的细胞更有效地稀释Celltrace Violet标记，从而导致荧光损失。测试40个小瓶以便验证照射过程。测试来自10个箱各自的4个小瓶，并用格式框标记。小瓶(例如1.1、1.2，...10.4)。

[0159] 复制能力测定表明，与未暴露于照射的细胞相比，所有40个测试小瓶都不能复制。图9中示出的数据代表了从所有40个测试小瓶的细胞中获得的数据。复制能力测定(CellTrace™ Violet(CTV)阳性)符合测试对照和有效性标准，并且与培养7天后的对照复制HS-110细胞群体相比，通过满足非复制细胞群中的>90％CTV染料的要求，所有40个测试的照射的细胞冷冻管均显示不能复制。另外，在第7天进行细胞计数(将活细胞和死细胞合并)，这也表明缺乏复制。例如，在第0天接种525,000个照射的细胞，并且在第7天的平均细胞计数为502,153个细胞，这表明缺乏细胞生长。

[0160] 图10示出了从最小和最大照射剂量位置(基于剂量分布数据)获取的三个小瓶的照射前细胞和三个小瓶的照射细胞的复制能力结果。这些数据表明所有照射的小瓶都不能复制。所有样品(具有冷冻保存的小瓶)均通过染料浸入测试来进行了容器密闭完整性测试，包括照射前的小瓶以及接受低剂量、中等剂量或高剂量照射的样品，这表明所述容器封闭系统在照射后保持完好无损并正常起作用。

[0161] 在第7天，所有40个照射的小瓶均满足>90％的细胞为CTV+的要求。表2概述了每个小瓶的结果，如下所示。在同一天读取的样品以下划线、斜体、粗体和粗体+斜体示出。在第7天进行细胞计数(将活细胞和死细胞合并)，并且它们也显示出缺乏复制。在第0天接种525,000个细胞，并且在第7天的平均细胞计数为502,153个细胞。

[0162]

样品编号	第 0 天 MFI	第 7 天 MFI	第 7 天 CTV +	第 7 天细胞计数
HS110 #1	*270400*	*802*	*5.08*	*8874000*
HS110 #2	***244103***	***706***	***5.03***	***3671250***
HS110 #3	**308155**	**822**	**5.03**	**6656000**
HS110 #4	250427	610	5.03	5985000
HS110 MMC #1	*377065*	*101930*	*99.9*	*498270*
HS110 MMC #2	**358664**	**110524**	**99.9**	**582000**
HS110 MMC #3	310677	110462	99.8	499550
HS110 照射 1.1	*297349*	*25800*	*94.1*	*583000*
HS110 照射 1.2	*295184*	*24965*	*93.5*	*537000*
HS110 照射 1.3	*287730*	*23982*	*93.6*	*525300*
HS110 照射 1.4	*301727*	*24874*	*93.8*	*454140*
HS110 照射 2.1	***248604***	***33811***	***95.5***	***416,000***
HS110 照射 2.2	***241442***	***32360***	***95.6***	***473000***
HS110 照射 2.3	***254114***	***36109***	***96.2***	***464000***
HS110 照射 2.4	*285634*	*23206*	*93.4*	*477400*
HS110 照射 3.1	***306170***	***39419***	***96.2***	***513333***
HS110 照射 3.2	***291966***	***36241***	***95.8***	***522667***
HS110 照射 3.3	***261652***	***33687***	***95.6***	***544277***
HS110 照射 3.4	*295184*	*24693*	*93.7*	*573000*
HS110 照射 4.1	***264536***	***33934***	***95.6***	***530277***
HS110 照射 4.2	***286680***	***36910***	***96.5***	***462000***
HS110 照射 4.3	***263572***	***34434***	***96.1***	***469722***
HS110 照射 4.4	*288783*	*24603*	*93.6*	*550000*
HS110 照射 5.1	***265505***	***34814***	***96.1***	***527778***
HS110 照射 5.2	**298941**	**36930**	**95.8**	**549667**
HS110 照射 5.3	**294935**	**36190**	**95.5**	**549333**
HS110 照射 5.4	*301727*	*26760*	*94.6*	*563200*
HS110 照射 6.1	**281332**	**35108**	**95.2**	**519167**

[0163]

HS110 照射 6.2	**285153**	**35705**	**95.7**	**503556**
HS110 照射 6.3	***291966***	***24874***	***94***	***532800***
HS110 照射 6.4	*283555*	*24246*	*94*	*520000*
HS110 照射 7.1	**293942**	**36558**	**95.3**	**485556**
HS110 照射 7.2	**262094**	**33040**	**94.8**	**473000**
HS110 照射 7.3	**280384**	**34990**	**95.1**	**546889**
HS110 照射 7.4	**255978**	**29752**	**96**	**512300**
HS110 照射 8.1	**298941**	**36806**	**95.4**	**481667**
HS110 照射 8.2	**306083**	**38978**	**95.8**	**473667**
HS110 照射 8.3	**291966**	**37813**	**96**	**480000**
HS110 照射 8.4	234486	27154	95.9	585000
HS110 照射 9.1	244997	27655	96.4	390720
HS110 照射 9.2	245894	28580	96	534100
HS110 照射 9.3	241442	28895	96.2	377760
HS110 照射 9.4	242326	28789	96.3	452270
HS110 照射 10.1	264536	31199	96.1	407000
HS110 照射 10.2	239684	29535	96.5	510600
HS110 照射 10.3	248604	31313	96.8	515000
HS110 照射 10.4	298438	35715	97.2	500000

[0164] 表3.统计学数据分析:在40个测试的照射样品中,100%被测试为不能复制。

[0165]

统计	未照射的HS110	MMC HS110	照射的HS110
平均第0天MFI	268,271.25	348,802.00	275,580.90
%CV第0天MFI	9.31%	8.02%	8.07%
平均第7天MFI	735.00	107,638.67	31,510.68
%CV第7天MFI	11.49%	3.75%	15.52%
平均第7天CTV+	5.04	99.87	95.39
%CV第7天CTV+	0.43%	0.05%	1.06%
平均第7天细胞计数	6,296,562.50	526,606.67	502,153.65
%CV第7天细胞计数	29.46%	7.44%	9.80%

[0166] 实施例3:比较研究

[0167] 在先前的照射程序中,所述方案包括:a)收获细胞,b)照射(12,000拉德,悬浮液、CM1培养基、冰),c)洗涤、冷冻保存、装瓶,以及d)冷冻至-70℃->LN2(参见图11)。具体而言,培养细胞,收获细胞(在离心管中),将其重悬于含有9%FBS的IMDM培养基中,并在湿冰上的250mL离心管中作为散装细胞悬浮液(每毫升约20x 10 ^{6}个细胞)以120戈瑞照射。照射后,在无菌填充和冷冻步骤之前,通过用洗涤培养基洗涤两次并最终将细胞悬浮在药物产品冷冻保存培养基中来进一步处理散装疫苗。用此程序照射两个所制造的膀胱疫苗产品批次。测试这些批次(HBIB05和HBIB06),并显示在照射后保留可接受的细胞活力水平和gp96-Ig表达。另外,如通过FACs CellTrace™ Violet或氚化(^{3}H)-胸腺嘧啶核苷掺入方法所测定,照射的细胞显示为不能复制。尽管此过程的结果是可接受的,但为了保持细胞活力,所述过程需要与细胞培养制造设施非常接近(并与之紧密结合)的照射设施。这种组合在行业中并不常见,因此在放大并将操作转移给非学术制造商后,保留这种组合是不可行的。

[0168] 因此,在本公开的当前方法中,配制最终产物,将其填充到单剂量小瓶中,并以未

照射状态置于低温储存器中。仅在将产品冷冻后，然后将其运送到单独的设施进行照射(冷冻小瓶以LN2干托运器单元运送，然后将其转移到装有干冰的冷却器中进行照射过程)。改进方法的程序包括：a)收获细胞，b)洗涤、冷冻保存、装瓶，c)冷冻至-70℃，e)照射(12,000拉德，在干冰上的小瓶)，以及f)转移至LN2。图12和图13比较了照射/冷冻的细胞(Irr/Fr)对比冷冻/辐照的细胞(Fr/Irr)的回收率、活力和HLA-A1表达。结果表明，冷冻且照射后细胞活力、回收率和HLA-A1表达略有提高。比较照射/冷冻的细胞(Irr/Fr)和冷冻/照射的细胞(Fr/Irr)中GP96-Ig分泌的Elisa数据，显示在冷冻和照射条件之后，GP96-Ig显著提高(参见图14)。比较未照射细胞、照射/冷冻的细胞(Irr/Fr)和冷冻/照射的细胞(Fr/Irr)的胸腺嘧啶核苷吸收，也显示在冷冻和照射后有所改善(参见图15和图16)。

[0169] 总之，保持细胞活力的改进方法不需要与细胞培养制造设施非常接近(并与之紧密结合)的照射设施，从而使其能够放大和转移。

[0170] 其他实施方案

[0171] 应当理解，虽然本公开已结合其详细描述来描述，前面的描述旨在说明而非限制本公开的范围，所述范围由所附权利要求书的范围所限定。其他方面、优点和修改是在以下权利要求书的范围之内。

[0172] 以引用的方式并入

[0173] 本文引用的所有专利和出版物以引用的方式整体并入本文。

[0174] 本文所讨论的出版物仅为其在本申请的申请日之前公开而提供。本文没有任何内容被解释为承认本发明没有资格先于现有发明的这种出版物。

[0175] 在本文中，所有的标题仅仅是用于组织，而不是意图以任何方式限制本公开。

[0001] 序列表

[0002] <110> 热生物制品有限公司(Heat Biologics, Inc.)

[0003] 哈利特·达米安(Hallett, Damien)

[0004] <120> 基于细胞的疫苗的生产

[0005] <130> HTB-028PC/114358-5007

[0006] <150> 62/594,317

[0007] <151> 2017-12-04

[0008] <160> 2

[0009] <170> PatentIn version 3.5

[0010] <210> 1

[0011] <211> 803

[0012] <212> PRT

[0013] <213> 智人(Homo sapiens)

[0014] <400> 1

[0015] Met Arg Ala Leu Trp Val Leu Gly Leu Cys Cys Val Leu Leu Thr Phe

[0016] 1 5 10 15

[0017] Gly Ser Val Arg Ala Asp Asp Glu Val Asp Val Asp Gly Thr Val Glu

[0018] 20 25 30

[0019] Glu Asp Leu Gly Lys Ser Arg Glu Gly Ser Arg Thr Asp Asp Glu Val

[0020] 35 40 45

[0021] Val Gln Arg Glu Glu Glu Ala Ile Gln Leu Asp Gly Leu Asn Ala Ser

[0022] 50 55 60

[0023] Gln Ile Arg Glu Leu Arg Glu Lys Ser Glu Lys Phe Ala Phe Gln Ala

[0024] 65 70 75 80

[0025] Glu Val Asn Arg Met Met Lys Leu Ile Ile Asn Ser Leu Tyr Lys Asn

[0026] 85 90 95

[0027] Lys Glu Ile Phe Leu Arg Glu Leu Ile Ser Asn Ala Ser Asp Ala Leu

[0028] 100 105 110

[0029] Asp Lys Ile Arg Leu Ile Ser Leu Thr Asp Glu Asn Ala Leu Ser Gly

[0030] 115 120 125

[0031] Asn Glu Glu Leu Thr Val Lys Ile Lys Cys Asp Lys Glu Lys Asn Leu

[0032] 130 135 140

[0033] Leu His Val Thr Asp Thr Gly Val Gly Met Thr Arg Glu Glu Leu Val

[0034] 145 150 155 160

[0035] Lys Asn Leu Gly Thr Ile Ala Lys Ser Gly Thr Ser Glu Phe Leu Asn

[0036] 165 170 175

[0037] Lys Met Thr Glu Ala Gln Glu Asp Gly Gln Ser Thr Ser Glu Leu Ile

[0038] 180 185 190

[0039] Gly Gln Phe Gly Val Gly Phe Tyr Ser Ala Phe Leu Val Ala Asp Lys
[0040] 195 200 205
[0041] Val Ile Val Thr Ser Lys His Asn Asn Asp Thr Gln His Ile Trp Glu
[0042] 210 215 220
[0043] Ser Asp Ser Asn Glu Phe Ser Val Ile Ala Asp Pro Arg Gly Asn Thr
[0044] 225 230 235 240
[0045] Leu Gly Arg Gly Thr Thr Ile Thr Leu Val Leu Lys Glu Glu Ala Ser
[0046] 245 250 255
[0047] Asp Tyr Leu Glu Leu Asp Thr Ile Lys Asn Leu Val Lys Lys Tyr Ser
[0048] 260 265 270
[0049] Gln Phe Ile Asn Phe Pro Ile Tyr Val Trp Ser Ser Lys Thr Glu Thr
[0050] 275 280 285
[0051] Val Glu Glu Pro Met Glu Glu Glu Glu Ala Ala Lys Glu Glu Lys Glu
[0052] 290 295 300
[0053] Glu Ser Asp Asp Glu Ala Ala Val Glu Glu Glu Glu Glu Glu Lys Lys
[0054] 305 310 315 320
[0055] Pro Lys Thr Lys Lys Val Glu Lys Thr Val Trp Asp Trp Glu Leu Met
[0056] 325 330 335
[0057] Asn Asp Ile Lys Pro Ile Trp Gln Arg Pro Ser Lys Glu Val Glu Glu
[0058] 340 345 350
[0059] Asp Glu Tyr Lys Ala Phe Tyr Lys Ser Phe Ser Lys Glu Ser Asp Asp
[0060] 355 360 365
[0061] Pro Met Ala Tyr Ile His Phe Thr Ala Glu Gly Glu Val Thr Phe Lys
[0062] 370 375 380
[0063] Ser Ile Leu Phe Val Pro Thr Ser Ala Pro Arg Gly Leu Phe Asp Glu
[0064] 385 390 395 400
[0065] Tyr Gly Ser Lys Lys Ser Asp Tyr Ile Lys Leu Tyr Val Arg Arg Val
[0066] 405 410 415
[0067] Phe Ile Thr Asp Asp Phe His Asp Met Met Pro Lys Tyr Leu Asn Phe
[0068] 420 425 430
[0069] Val Lys Gly Val Val Asp Ser Asp Asp Leu Pro Leu Asn Val Ser Arg
[0070] 435 440 445
[0071] Glu Thr Leu Gln Gln His Lys Leu Leu Lys Val Ile Arg Lys Lys Leu
[0072] 450 455 460
[0073] Val Arg Lys Thr Leu Asp Met Ile Lys Lys Ile Ala Asp Asp Lys Tyr
[0074] 465 470 475 480
[0075] Asn Asp Thr Phe Trp Lys Glu Phe Gly Thr Asn Ile Lys Leu Gly Val
[0076] 485 490 495
[0077] Ile Glu Asp His Ser Asn Arg Thr Arg Leu Ala Lys Leu Leu Arg Phe

[0078] 500 505 510

[0079] Gln Ser Ser His His Pro Thr Asp Ile Thr Ser Leu Asp Gln Tyr Val

[0080] 515 520 525

[0081] Glu Arg Met Lys Glu Lys Gln Asp Lys Ile Tyr Phe Met Ala Gly Ser

[0082] 530 535 540

[0083] Ser Arg Lys Glu Ala Glu Ser Ser Pro Phe Val Glu Arg Leu Leu Lys

[0084] 545 550 555 560

[0085] Lys Gly Tyr Glu Val Ile Tyr Leu Thr Glu Pro Val Asp Glu Tyr Cys

[0086] 565 570 575

[0087] Ile Gln Ala Leu Pro Glu Phe Asp Gly Lys Arg Phe Gln Asn Val Ala

[0088] 580 585 590

[0089] Lys Glu Gly Val Lys Phe Asp Glu Ser Glu Lys Thr Lys Glu Ser Arg

[0090] 595 600 605

[0091] Glu Ala Val Glu Lys Glu Phe Glu Pro Leu Leu Asn Trp Met Lys Asp

[0092] 610 615 620

[0093] Lys Ala Leu Lys Asp Lys Ile Glu Lys Ala Val Val Ser Gln Arg Leu

[0094] 625 630 635 640

[0095] Thr Glu Ser Pro Cys Ala Leu Val Ala Ser Gln Tyr Gly Trp Ser Gly

[0096] 645 650 655

[0097] Asn Met Glu Arg Ile Met Lys Ala Gln Ala Tyr Gln Thr Gly Lys Asp

[0098] 660 665 670

[0099] Ile Ser Thr Asn Tyr Tyr Ala Ser Gln Lys Lys Thr Phe Glu Ile Asn

[0100] 675 680 685

[0101] Pro Arg His Pro Leu Ile Arg Asp Met Leu Arg Arg Ile Lys Glu Asp

[0102] 690 695 700

[0103] Glu Asp Asp Lys Thr Val Leu Asp Leu Ala Val Val Leu Phe Glu Thr

[0104] 705 710 715 720

[0105] Ala Thr Leu Arg Ser Gly Tyr Leu Leu Pro Asp Thr Lys Ala Tyr Gly

[0106] 725 730 735

[0107] Asp Arg Ile Glu Arg Met Leu Arg Leu Ser Leu Asn Ile Asp Pro Asp

[0108] 740 745 750

[0109] Ala Lys Val Glu Glu Glu Pro Glu Glu Glu Pro Glu Glu Thr Ala Glu

[0110] 755 760 765

[0111] Asp Thr Thr Glu Asp Thr Glu Gln Asp Glu Asp Glu Glu Met Asp Val

[0112] 770 775 780

[0113] Gly Thr Asp Glu Glu Glu Glu Thr Ala Lys Glu Ser Thr Ala Glu Lys

[0114] 785 790 795 800

[0115] Asp Glu Leu

[0116] <210> 2

[0117] <211> 799

[0118] <212> PRT

[0119] <213> 智人(Homo sapiens)

[0120] <400> 2

[0121] Met Arg Ala Leu Trp Val Leu Gly Leu Cys Cys Val Leu Leu Thr Phe

[0122] 1 5 10 15

[0123] Gly Ser Val Arg Ala Asp Asp Glu Val Asp Val Asp Gly Thr Val Glu

[0124] 20 25 30

[0125] Glu Asp Leu Gly Lys Ser Arg Glu Gly Ser Arg Thr Asp Asp Glu Val

[0126] 35 40 45

[0127] Val Gln Arg Glu Glu Glu Ala Ile Gln Leu Asp Gly Leu Asn Ala Ser

[0128] 50 55 60

[0129] Gln Ile Arg Glu Leu Arg Glu Lys Ser Glu Lys Phe Ala Phe Gln Ala

[0130] 65 70 75 80

[0131] Glu Val Asn Arg Met Met Lys Leu Ile Ile Asn Ser Leu Tyr Lys Asn

[0132] 85 90 95

[0133] Lys Glu Ile Phe Leu Arg Glu Leu Ile Ser Asn Ala Ser Asp Ala Leu

[0134] 100 105 110

[0135] Asp Lys Ile Arg Leu Ile Ser Leu Thr Asp Glu Asn Ala Leu Ser Gly

[0136] 115 120 125

[0137] Asn Glu Glu Leu Thr Val Lys Ile Lys Cys Asp Lys Glu Lys Asn Leu

[0138] 130 135 140

[0139] Leu His Val Thr Asp Thr Gly Val Gly Met Thr Arg Glu Glu Leu Val

[0140] 145 150 155 160

[0141] Lys Asn Leu Gly Thr Ile Ala Lys Ser Gly Thr Ser Glu Phe Leu Asn

[0142] 165 170 175

[0143] Lys Met Thr Glu Ala Gln Glu Asp Gly Gln Ser Thr Ser Glu Leu Ile

[0144] 180 185 190

[0145] Gly Gln Phe Gly Val Gly Phe Tyr Ser Ala Phe Leu Val Ala Asp Lys

[0146] 195 200 205

[0147] Val Ile Val Thr Ser Lys His Asn Asn Asp Thr Gln His Ile Trp Glu

[0148] 210 215 220

[0149] Ser Asp Ser Asn Glu Phe Ser Val Ile Ala Asp Pro Arg Gly Asn Thr

[0150] 225 230 235 240

[0151] Leu Gly Arg Gly Thr Thr Ile Thr Leu Val Leu Lys Glu Glu Ala Ser

[0152] 245 250 255

[0153] Asp Tyr Leu Glu Leu Asp Thr Ile Lys Asn Leu Val Lys Lys Tyr Ser

[0154] 260 265 270

[0155] Gln Phe Ile Asn Phe Pro Ile Tyr Val Trp Ser Ser Lys Thr Glu Thr

[0156] 275 280 285

[0157] Val Glu Glu Pro Met Glu Glu Glu Glu Ala Ala Lys Glu Glu Lys Glu

[0158] 290 295 300

[0159] Glu Ser Asp Asp Glu Ala Ala Val Glu Glu Glu Glu Glu Glu Lys Lys

[0160] 305 310 315 320

[0161] Pro Lys Thr Lys Lys Val Glu Lys Thr Val Trp Asp Trp Glu Leu Met

[0162] 325 330 335

[0163] Asn Asp Ile Lys Pro Ile Trp Gln Arg Pro Ser Lys Glu Val Glu Glu

[0164] 340 345 350

[0165] Asp Glu Tyr Lys Ala Phe Tyr Lys Ser Phe Ser Lys Glu Ser Asp Asp

[0166] 355 360 365

[0167] Pro Met Ala Tyr Ile His Phe Thr Ala Glu Gly Glu Val Thr Phe Lys

[0168] 370 375 380

[0169] Ser Ile Leu Phe Val Pro Thr Ser Ala Pro Arg Gly Leu Phe Asp Glu

[0170] 385 390 395 400

[0171] Tyr Gly Ser Lys Lys Ser Asp Tyr Ile Lys Leu Tyr Val Arg Arg Val

[0172] 405 410 415

[0173] Phe Ile Thr Asp Asp Phe His Asp Met Met Pro Lys Tyr Leu Asn Phe

[0174] 420 425 430

[0175] Val Lys Gly Val Val Asp Ser Asp Asp Leu Pro Leu Asn Val Ser Arg

[0176] 435 440 445

[0177] Glu Thr Leu Gln Gln His Lys Leu Leu Lys Val Ile Arg Lys Lys Leu

[0178] 450 455 460

[0179] Val Arg Lys Thr Leu Asp Met Ile Lys Lys Ile Ala Asp Asp Lys Tyr

[0180] 465 470 475 480

[0181] Asn Asp Thr Phe Trp Lys Glu Phe Gly Thr Asn Ile Lys Leu Gly Val

[0182] 485 490 495

[0183] Ile Glu Asp His Ser Asn Arg Thr Arg Leu Ala Lys Leu Leu Arg Phe

[0184] 500 505 510

[0185] Gln Ser Ser His His Pro Thr Asp Ile Thr Ser Leu Asp Gln Tyr Val

[0186] 515 520 525

[0187] Glu Arg Met Lys Glu Lys Gln Asp Lys Ile Tyr Phe Met Ala Gly Ser

[0188] 530 535 540

[0189] Ser Arg Lys Glu Ala Glu Ser Ser Pro Phe Val Glu Arg Leu Leu Lys

[0190] 545 550 555 560

[0191] Lys Gly Tyr Glu Val Ile Tyr Leu Thr Glu Pro Val Asp Glu Tyr Cys

[0192] 565 570 575

[0193] Ile Gln Ala Leu Pro Glu Phe Asp Gly Lys Arg Phe Gln Asn Val Ala

[0194] 580 585 590

[0195] Lys Glu Gly Val Lys Phe Asp Glu Ser Glu Lys Thr Lys Glu Ser Arg
[0196] 595 600 605
[0197] Glu Ala Val Glu Lys Glu Phe Glu Pro Leu Leu Asn Trp Met Lys Asp
[0198] 610 615 620
[0199] Lys Ala Leu Lys Asp Lys Ile Glu Lys Ala Val Val Ser Gln Arg Leu
[0200] 625 630 635 640
[0201] Thr Glu Ser Pro Cys Ala Leu Val Ala Ser Gln Tyr Gly Trp Ser Gly
[0202] 645 650 655
[0203] Asn Met Glu Arg Ile Met Lys Ala Gln Ala Tyr Gln Thr Gly Lys Asp
[0204] 660 665 670
[0205] Ile Ser Thr Asn Tyr Tyr Ala Ser Gln Lys Lys Thr Phe Glu Ile Asn
[0206] 675 680 685
[0207] Pro Arg His Pro Leu Ile Arg Asp Met Leu Arg Arg Ile Lys Glu Asp
[0208] 690 695 700
[0209] Glu Asp Asp Lys Thr Val Leu Asp Leu Ala Val Val Leu Phe Glu Thr
[0210] 705 710 715 720
[0211] Ala Thr Leu Arg Ser Gly Tyr Leu Leu Pro Asp Thr Lys Ala Tyr Gly
[0212] 725 730 735
[0213] Asp Arg Ile Glu Arg Met Leu Arg Leu Ser Leu Asn Ile Asp Pro Asp
[0214] 740 745 750
[0215] Ala Lys Val Glu Glu Glu Pro Glu Glu Glu Pro Glu Glu Thr Ala Glu
[0216] 755 760 765
[0217] Asp Thr Thr Glu Asp Thr Glu Gln Asp Glu Asp Glu Glu Met Asp Val
[0218] 770 775 780
[0219] Gly Thr Asp Glu Glu Glu Glu Thr Ala Lys Glu Ser Thr Ala Glu
[0220] 785 790 795

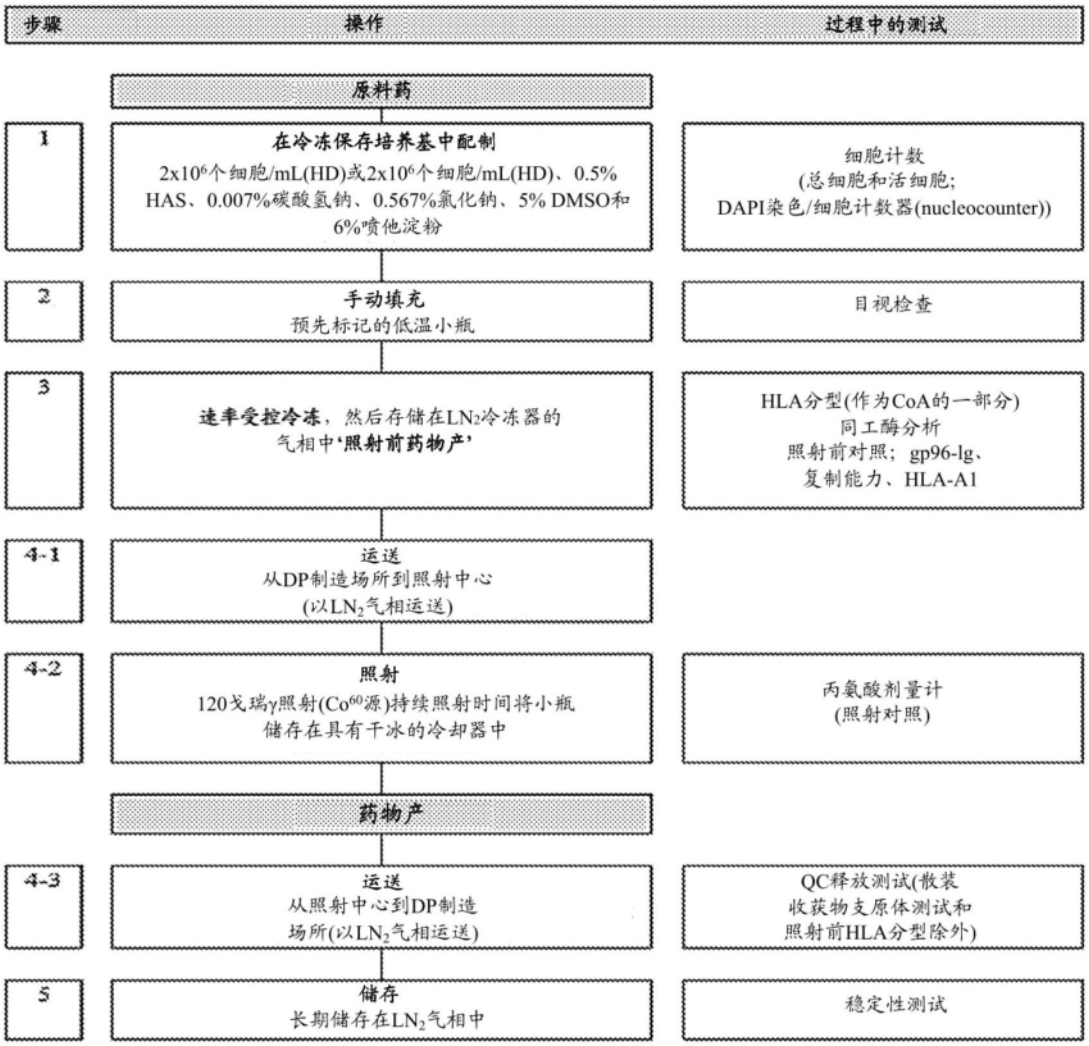

步骤
操作
过程中的测试
原料药
1
在冷冻保存培养基中配制
2x10⁶个细胞/mL(HD)或2x10⁶个细胞/mL(HD)、0.5% HAS、0.007%碳酸氢钠、0.567%氯化钠、5% DMSO和6%喷他淀粉
细胞计数
(总细胞和活细胞;
DAPI染色/细胞计数器(nucleocounter))
2
手动填充
预先标记的低温小瓶
目视检查
3
速率受控冷冻，然后存储在LN2冷冻器的气相中'照射前药物产'
HLA分型(作为CoA的一部分)
同工酶分析
照射前对照; gp96-lg、
复制能力、HLA-A1
4-1
运送
从DP制造场所到照射中心
(以LN2气相运送)
4-2
照射
120戈瑞γ照射(Co60源)持续照射时间将小瓶储存在具有干冰的冷却器中
丙氨酸剂量计
(照射对照)
药物产
4-3
运送
从照射中心到DP制造场所(以LN2气相运送)
QC释放测试(散装收获物支原体测试和照射前HLA分型除外)
5
储存
长期储存在LN2气相中
稳定性测试

图1

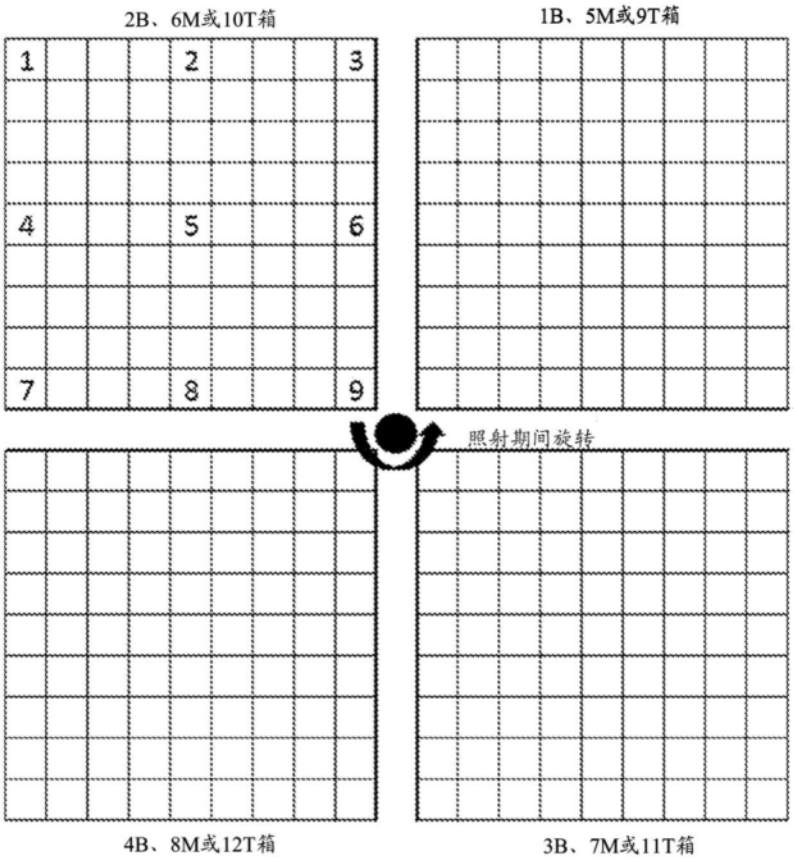

2B、6M或10T箱
1B、5M或9T箱
1
2
3
4
5
6
7
8
9
照射期间旋转
4B、8M或12T箱
3B、7M或11T箱

图2

在T、M或B层的每个箱内具有剂量计的小瓶位置	1	2	3
	4	5	6
	7	8	9

剂量率分布研究 - 剂量(戈瑞/分钟)

顶层(T)的箱	14.2	14.0	13.9
	14.0	13.8	13.6
	13.8	13.6	13.5
中层(M)的箱	14.0	13.9	13.7
	13.8	13.6	13.5
	13.7	13.5	13.5
底层(B)的箱	13.9	13.2	13.0
	13.4	12.5	12.0
	13.0	12.1	11.7

图3

	样品编号	中值: FL1-A	CTV+::亲代频率
☐	HS410 第0天(虚线)	362210	n/a
☐	HS410 第7天	1009	5.03
☐	HS410 照射第0天(虚线)	330588	n/a
☐	HS410 照射第7天	47668	97.1
☐	HS410 1:50	1559	41.5
☐	HS410 1:100	18774	59.5
☐	HS410 1:200	35977	74.1
☐	HS410 1:500	41035	82.7
☐	HS410 1:1000(点线)	44961	88.3

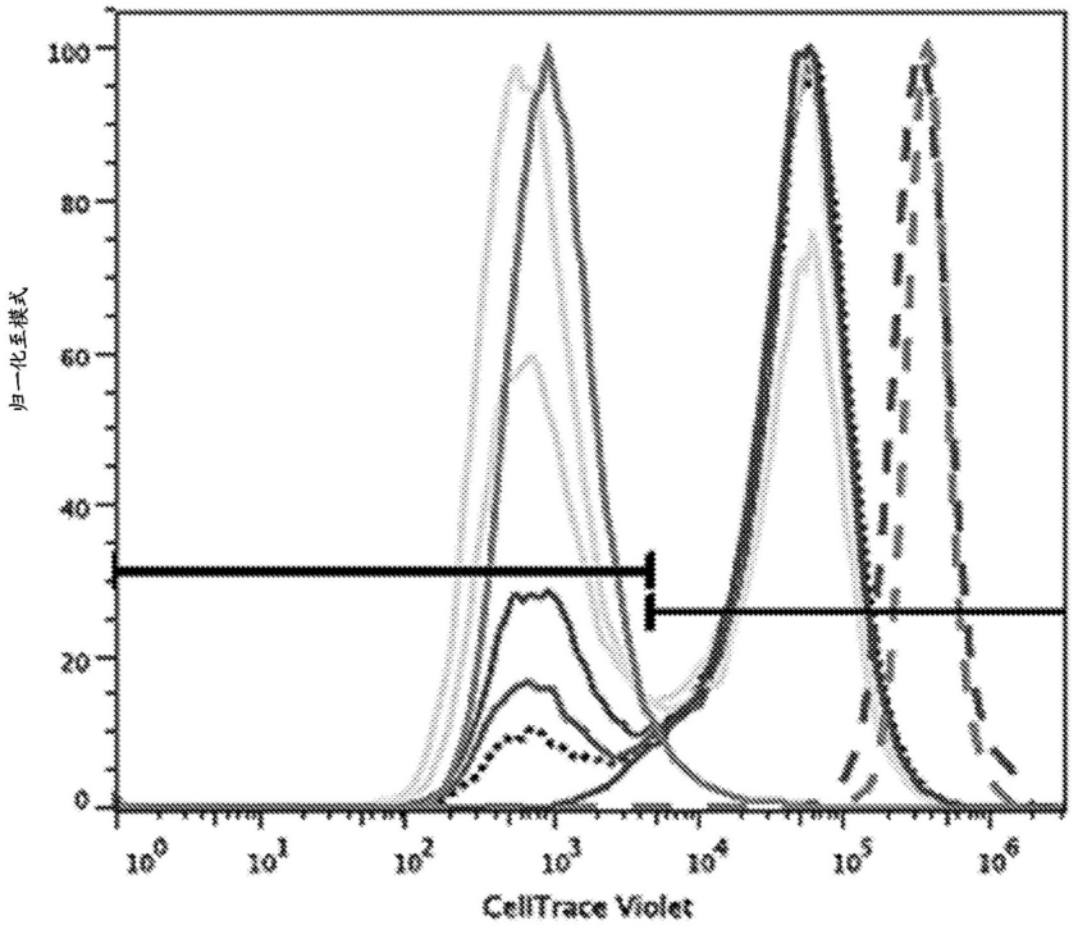


图4

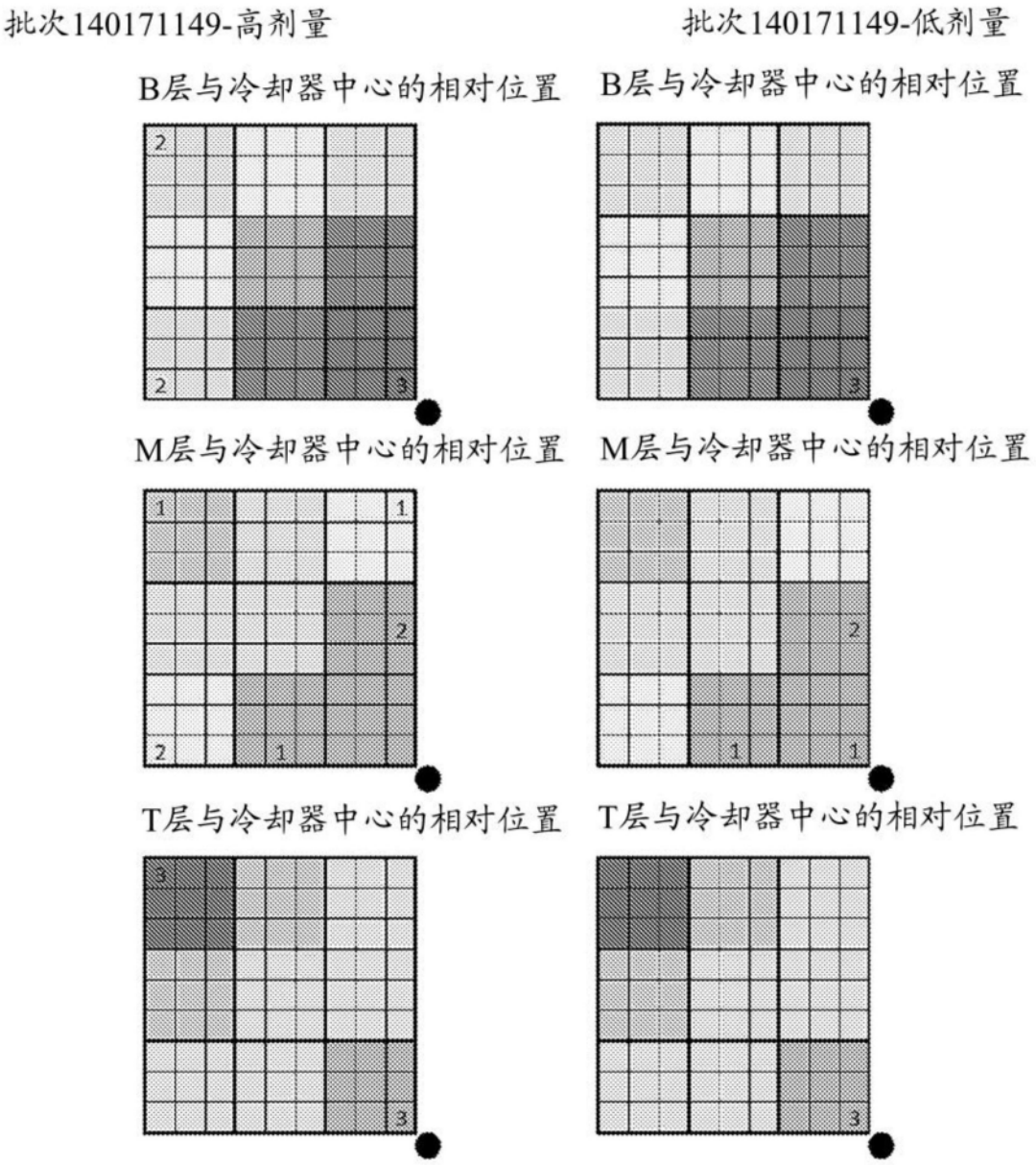

批次140171149-高剂量
批次140171149-低剂量
B层与冷却器中心的相对位置
B层与冷却器中心的相对位置
M层与冷却器中心的相对位置
M层与冷却器中心的相对位置
T层与冷却器中心的相对位置
T层与冷却器中心的相对位置

图5

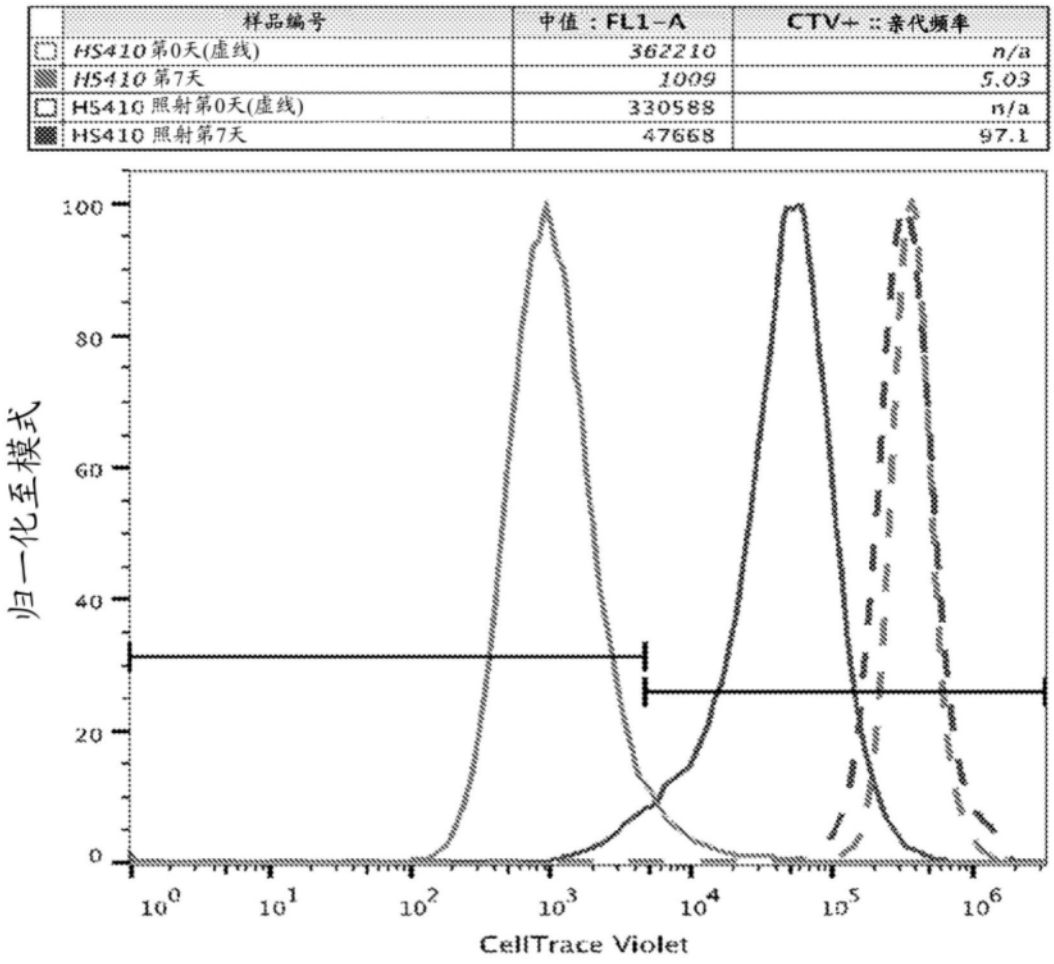

样品编号
中值：FL1-A
CTV+ ::亲代频率
HS410第0天(虚线)
362210
n/a
HS410 第7天
1009
5.03
HS410 照射第0天(虚线)
330588
n/a
HS410 照射第7天
47668
97.1
归一化至模式
100
80
60
40
20
0
10^0
10^1
10^2
10^3
10^4
10^5
10^6
CellTrace Violet

图6

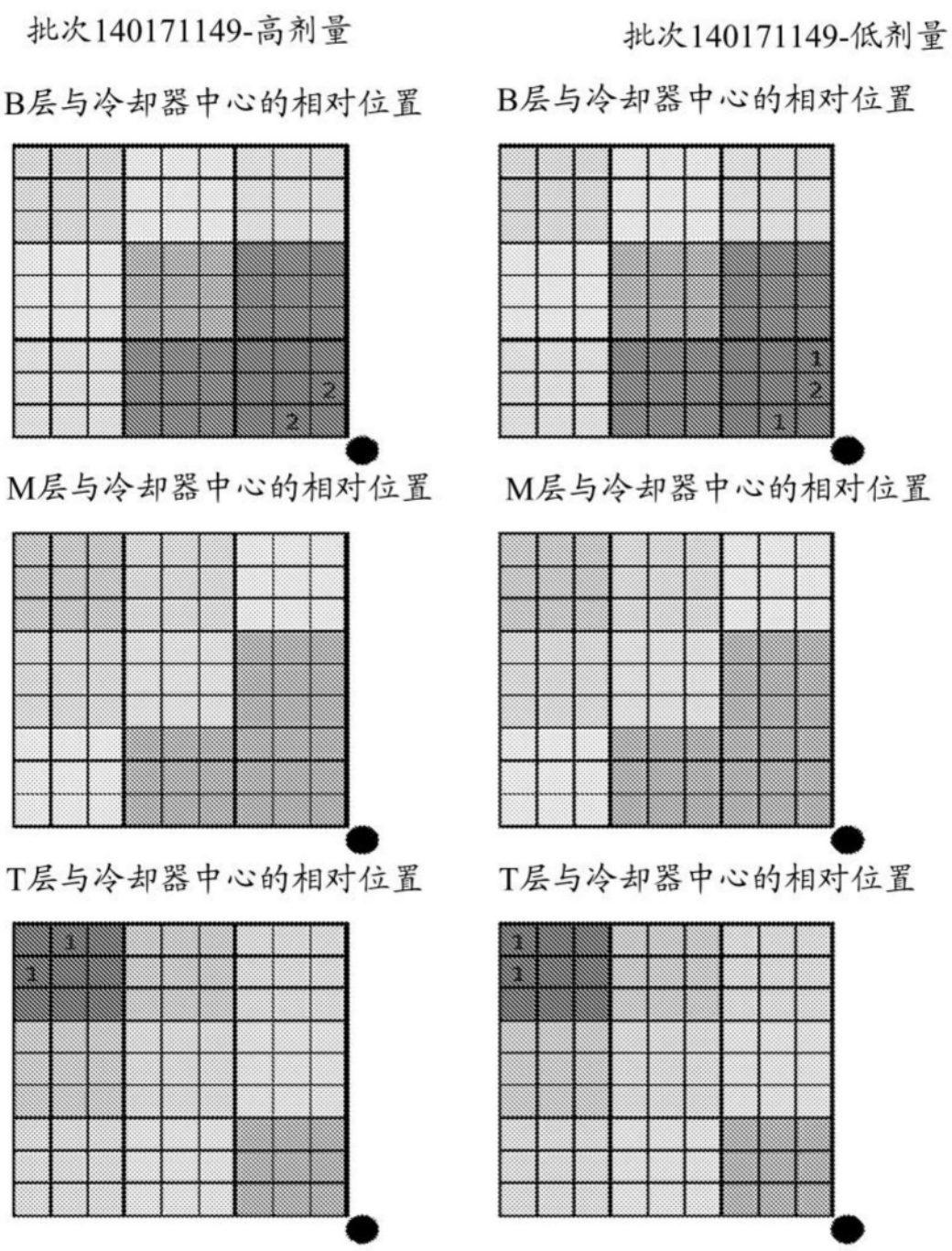

批次140171149-高剂量
B层与冷却器中心的相对位置
M层与冷却器中心的相对位置
T层与冷却器中心的相对位置
批次140171149-低剂量
B层与冷却器中心的相对位置
M层与冷却器中心的相对位置
T层与冷却器中心的相对位置

图7

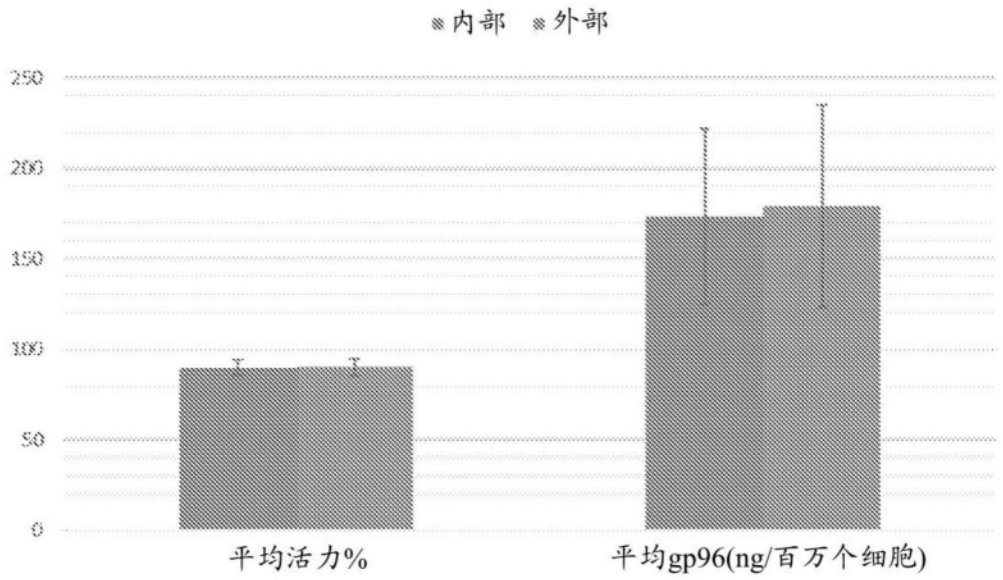

内部
外部
250
200
150
100
50
0
平均活力%
平均gp96(ng/百万个细胞)

图8

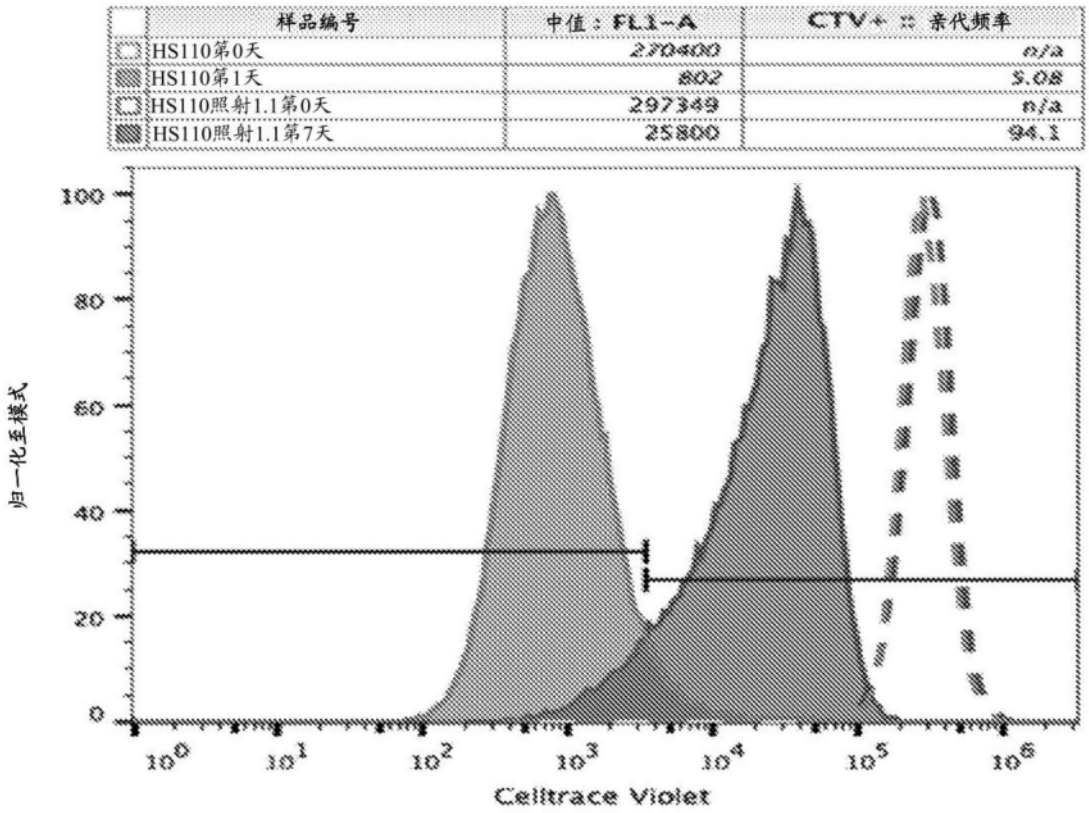

样品编号
中值：FL1-A
CTV+ :: 亲代频率
HS110第0天 270400 n/a
HS110第1天 802 5.08
HS110照射1.1第0天 297349 n/a
HS110照射1.1第7天 25800 94.1
归一化至模式
Celltrace Violet

图9

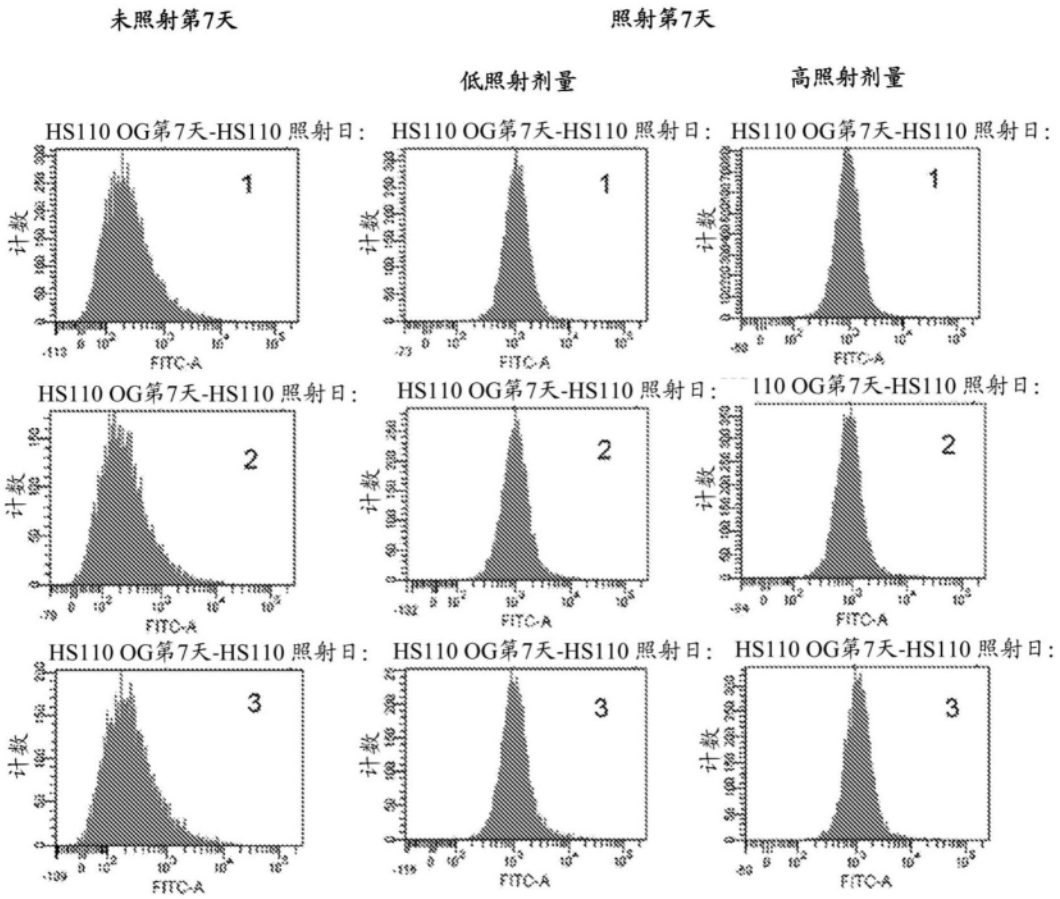

未照射第7天
照射第7天
低照射剂量
高照射剂量
HS110 OG第7天-HS110 照射日：
计数
FITC-A
1
2
3

图10

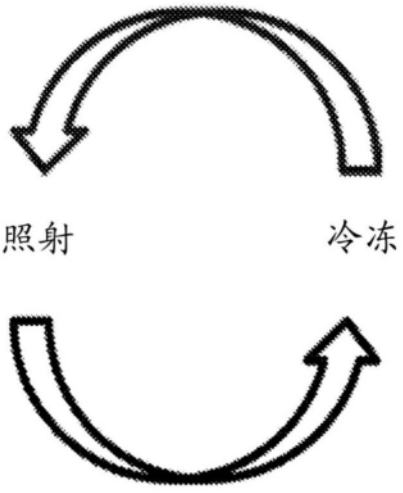

照射
冷冻

图11

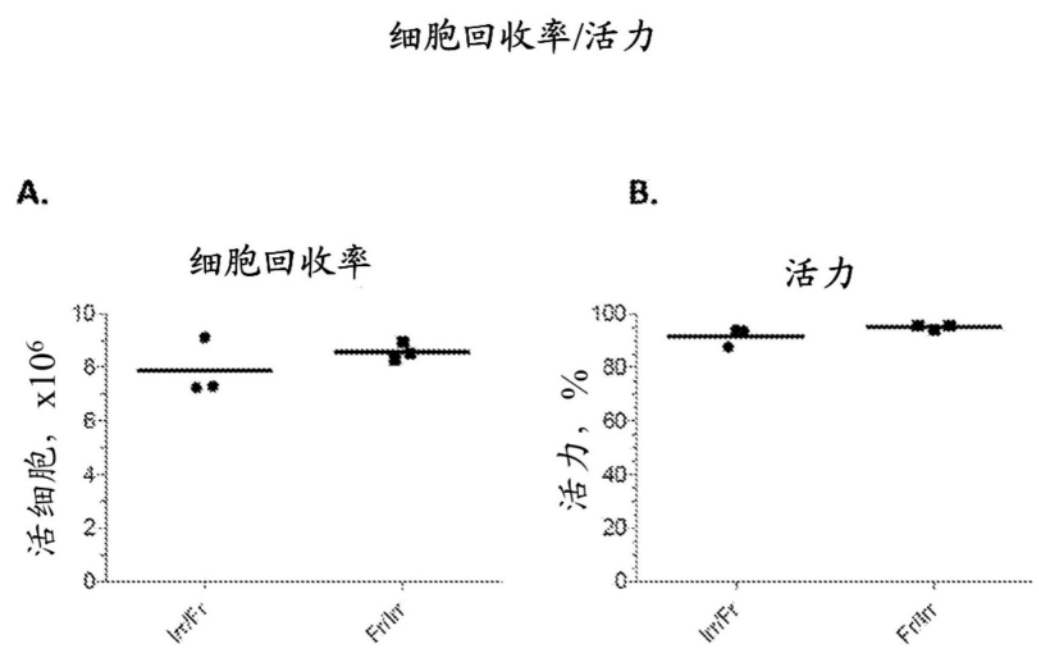

细胞回收率/活力
A.
细胞回收率
活细胞，x10⁶
Inf/Fr
Fr/Fr
B.
活力
活力，%
Inf/Fr
Fr/Fr

图12

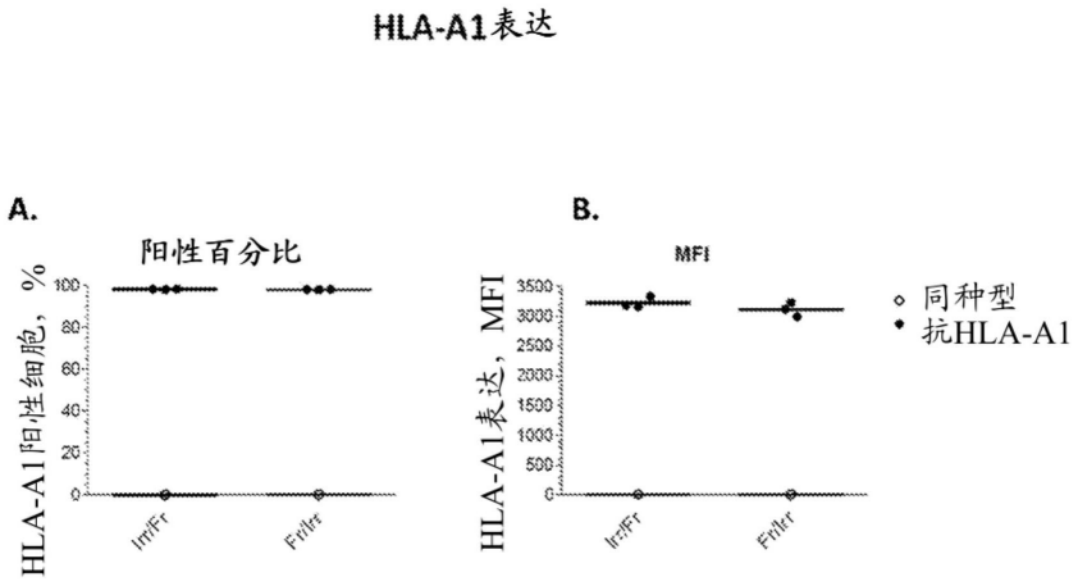

HLA-A1表达
A.
阳性百分比
HLA-A1阳性细胞，%
Inf/Fr
Fr/Fr
B.
MFI
HLA-A1表达，MFI
Inf/Fr
Fr/Fr
同种型
抗HLA-A1

图13

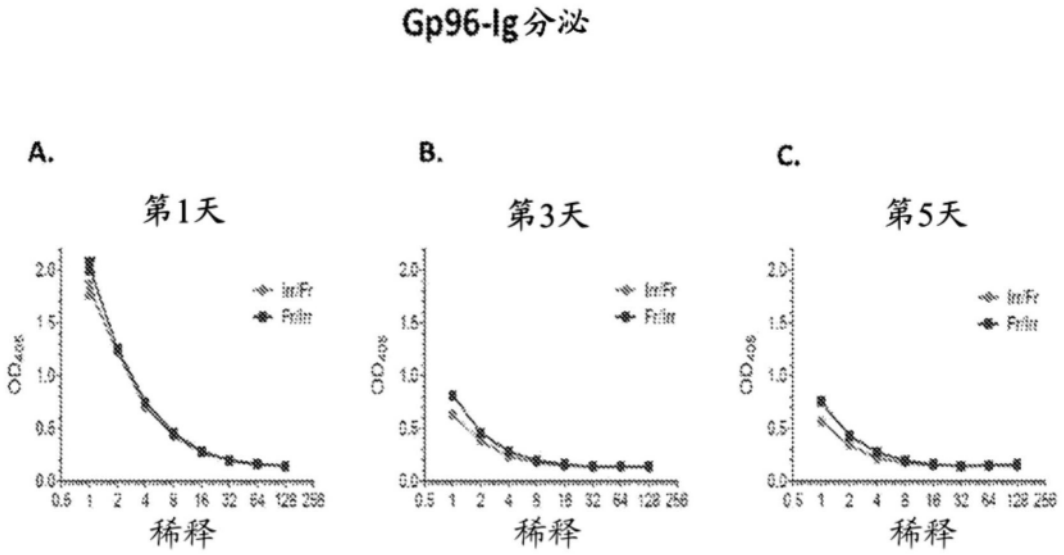

Gp96-Ig分泌
A.
第1天
B.
第3天
C.
第5天
Irr/Fr
Fr/Irr
稀释

图14

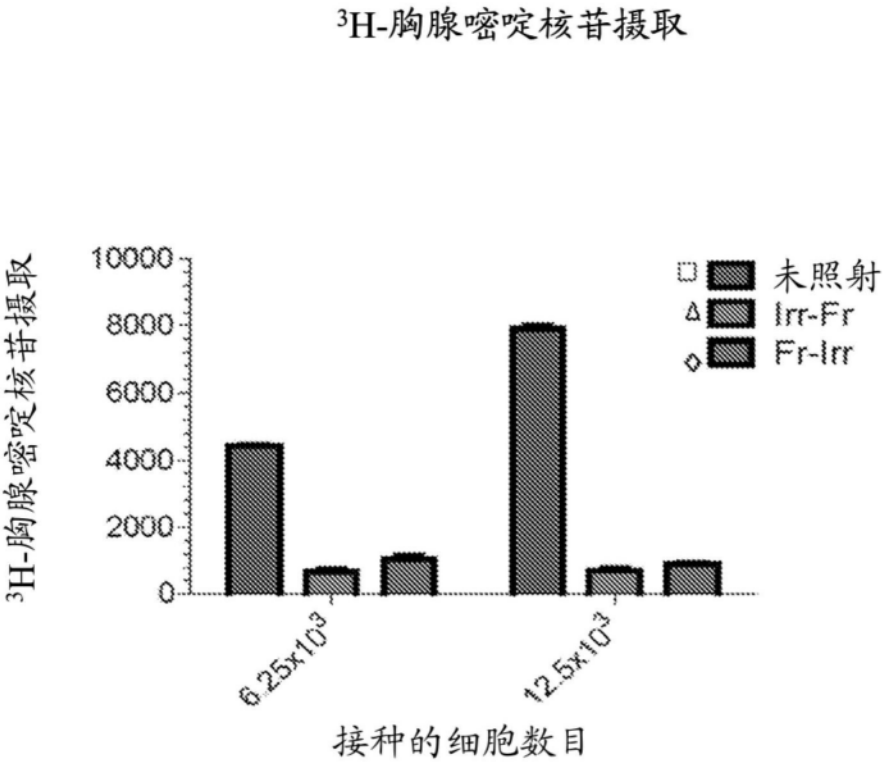

3H-胸腺嘧啶核苷摄取
未照射
Irr-Fr
Fr-Irr
10000
8000
6000
4000
2000
0
6.25x10^3
12.5x10^3
接种的细胞数目

图15

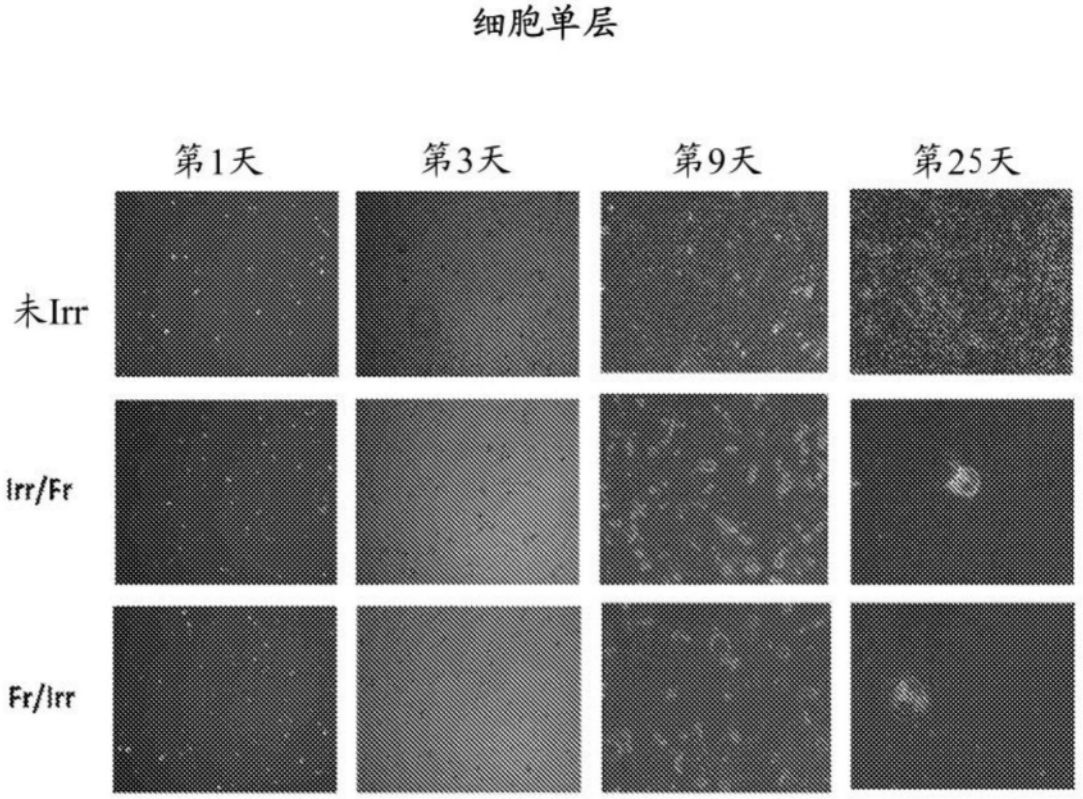


图16