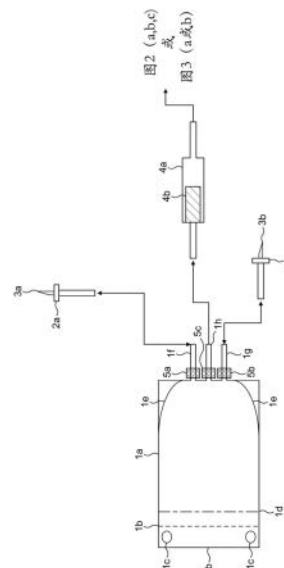




(43) 申请公布日 2022.10.25

权利要求书7页 说明书114页 附图79页

本发明提供用于分离和冷藏保存肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)和产生治疗性TIL群体的方法,包括通过使用试剂盒和半自动装置在TIL群体扩增之前对切除的肿瘤进行无菌分解、富集和冷冻保存的方法。本发明还提供用于扩增和/或稳定TIL(例如UTIL)的方法、涉及其的组合物和涉及其的治疗方法。



1. 一种用于制备肿瘤浸润淋巴细胞 (TIL) 的治疗性群体的方法, 包含:
 - (a) 无菌解聚从对象切除的肿瘤, 从而产生经解聚的肿瘤产物, 其中所述肿瘤被充分地解聚, 使得所述经解聚的肿瘤产物可被冷藏保存;
 - (b) 将所述经解聚的肿瘤产物冷却至适合的冷藏保存温度,
 - (c) 通过在包含 IL-2 的细胞培养基中培养冷藏保存的经解聚的肿瘤产物来进行第一扩增, 以产生 TIL 的第一群体;
 - (d) 通过与额外的 IL-2、OKT-3 及抗原呈递细胞 (APC) 一起培养所述 TIL 的第一群体来进行第二扩增, 以产生 TIL 的第二群体; 以及
 - (e) 收集和/或冷藏保存所述 TIL 的第二群体;其中所述解聚包含酶解聚及/或物理解聚, 其中所述物理解聚包含向所述切除的肿瘤施加的重复的物理压力;
其中步骤 (a) 至 (e) 在封闭系统中执行。
2. 根据权利要求 1 所述的方法, 其中所述解聚包含每分钟施加 120 至 360 次的高达 $6\text{N}/\text{cm}^2$, 优选为 $3\text{N}/\text{cm}^2$ 的重复物理压力。
3. 根据权利要求 1 或 2 所述的方法, 其中所述经解聚的肿瘤产物包含单细胞悬浮液。
4. 根据权利要求 1-3 中任意一项所述的方法, 其中所述切除的肿瘤在解聚之前未经片段化。
5. 根据权利要求 1-4 中任意一项所述的方法, 其中步骤 (a) 在适于酶消化的温度下进行。
6. 根据权利要求 1-5 中任意一项所述的方法, 其中步骤 (b) 包含将所述经解聚的肿瘤产物直接冷却至所述冷藏保存温度。
7. 根据权利要求 1-6 中任意一项所述的方法, 其中解聚时间段为 90 分钟或更短, 或 75 分钟或更短, 或 60 分钟或更短, 或 50 分钟或更短。
8. 根据权利要求 1-7 中任意一项所述的方法, 其中所述解聚为连续的或以至少一分钟的时间段进行。
9. 根据权利要求 1-8 中任意一项所述的方法, 其中所述肿瘤未经浸渍。
10. 根据权利要求 1-9 中任意一项所述的方法, 包含在受控温度装置中冷却所述经解聚的肿瘤产物, 所述受控温度装置经程序化为以恒定速率降低温度。
11. 根据权利要求 10 所述的方法, 其中所述冷藏保存温度为 $-80^\circ\text{C} \pm 10^\circ\text{C}$, 且所述装置经程序化以 $1^\circ\text{C}/\text{min}$ 或 $1.5^\circ\text{C}/\text{min}$ 或 $2^\circ\text{C}/\text{min}$ 或 $1^\circ\text{C}/\text{min} \pm 0.5^\circ\text{C}/\text{min}$ 或 $1^\circ\text{C}/\text{min} \pm 0.5^\circ\text{C}/\text{min}$ 或 $2^\circ\text{C}/\text{min} \pm 0.5^\circ\text{C}/\text{min}$ 来降低温度。
12. 根据权利要求 1-11 中任意一项所述的方法, 其中所述 TIL 包含 UTIL, 或其中所述 TIL 包含 MTIL。
13. 根据权利要求 1-12 中任意一项所述的方法, 其中所述 TIL 的第一群体为约 100 万至 2000 万个 TIL。
14. 根据权利要求 1-13 中任意一项所述的方法, 其中步骤 (c) 包含生长 TIL 以产生所述第一群体, 且步骤 (d) 的所述第二扩增包含快速扩增。
15. 根据权利要求 1-14 中任意一项所述的方法, 其中步骤 (c) 进行约两周, 且步骤 (d) 进行约两周。

16. 根据权利要求1-15中任意一项所述的方法, 其中步骤(c) 和/或步骤(d) 中的培养包括添加IL-7、IL-12、IL-15、IL-18、IL-21或其组合。

17. 根据权利要求1-16中任意一项所述的方法, 包含将切除的肿瘤组织置于具有解聚流体的柔性容器中、密封所述容器、使所述肿瘤组织进行物理和/或酶解聚, 及冷藏保存所述经解聚的肿瘤组织。

18. 一种冷藏保存的肿瘤浸润淋巴细胞 (TIL) 的治疗性群体, 其通过根据权利要求1至17中任意一项所述的方法获得。

19. 根据权利要求18所述的治疗性群体, 其中所述群体包含约 5×10^9 个至 5×10^{10} 个T细胞。

20. 一种根据权利要求18或19所述的治疗性群体的冷藏保存袋。

21. 根据权利要求20所述的冷藏保存袋, 其用于静脉输液。

22. 一种用于制备肿瘤浸润淋巴细胞 (TIL) 的治疗性群体的方法, 包含:

(a) 无菌解聚从对象切除的肿瘤, 从而产生经解聚的肿瘤产物, 其中所述肿瘤充分地解聚, 使得所述经解聚的肿瘤产物可被冷藏保存;

(b) 通过在包含IL-2的细胞培养基中培养冷藏保存的所述经解聚的肿瘤产物来进行第一扩增, 以产生TIL的第一群体;

(c) 通过与额外的IL-2、OKT-3及抗原呈递细胞 (APC) 一起培养所述TIL的第一群体来进行第二扩增, 以产生TIL的第二群体; 以及

(d) 收集和/或冷藏保存所述TIL的第二群体;

其中所述解聚包含酶解聚和/或物理解聚, 其中所述物理解聚包含向所述切除的肿瘤施加的重复的物理压力;

其中步骤(a) 至(d) 在封闭系统中执行。

23. 根据权利要求22所述的方法, 其中所述解聚包含每分钟施加120至360次的高达 $6\text{N}/\text{cm}^2$, 优选为 $3\text{N}/\text{cm}^2$ 的重复物理压力。

24. 根据权利要求22或23所述的方法, 其中所述经解聚的肿瘤产物包含单细胞悬浮液。

25. 根据权利要求22-24中任意一项所述的方法, 其中所述切除的肿瘤在解聚之前未经片段化。

26. 根据权利要求22-25中任意一项所述的方法, 其中步骤(a) 在适于酶消化的温度下进行。

27. 根据权利要求22-错误信息中任意一项所述的方法, 其中解聚时间段为90分钟或更短, 或75分钟或更短, 或60分钟或更短, 或50分钟或更短。

28. 根据权利要求22-27中任意一项所述的方法, 其中所述解聚为连续的或以至少一分钟的时间段进行。

29. 根据权利要求22-28中任意一项所述的方法, 其中所述肿瘤未经浸渍。

30. 根据权利要求22-29中任意一项所述的方法, 包含在受控温度装置中冷却所述经解聚的肿瘤产物, 所述受控温度装置经程序化为以恒定速率降低温度。

31. 根据权利要求30所述的方法, 其中所述冷藏保存温度为 $-80^\circ\text{C} \pm 10^\circ\text{C}$, 且所述装置经程序化以 $1^\circ\text{C}/\text{min}$ 或 $1.5^\circ\text{C}/\text{min}$ 或 $2^\circ\text{C}/\text{min}$ 或 $1^\circ\text{C}/\text{min} \pm 0.5^\circ\text{C}/\text{min}$ 或 $1^\circ\text{C}/\text{min} \pm 0.5^\circ\text{C}/\text{min}$ 或 $2^\circ\text{C}/\text{min} \pm 0.5^\circ\text{C}/\text{min}$ 来降低温度。

32. 根据权利要求22-31中任意一项所述的方法,其中所述TIL包含UTIL,或其中所述TIL包含MTIL。

33. 根据权利要求22-32中任意一项所述的方法,其中所述TIL的第一群体为约100万至2000万个TIL。

34. 根据权利要求22-33中任意一项所述的方法,其中步骤(b)包含生长TIL以产生所述第一群体,且步骤(c)的所述第二扩增包含快速扩增。

35. 根据权利要求22-34中任意一项所述的方法,其中步骤(b)进行约两周且步骤(c)进行约两周。

36. 根据权利要求22-35中任意一项所述的方法,其中步骤(b)和/或步骤(c)中的培养包括添加IL-7、IL-12、IL-15、IL-18、IL-21或其组合。

37. 根据权利要求22-36中任意一项所述的方法,包含将切除的肿瘤组织置于具有解聚流体的柔性容器中、密封所述容器、使所述肿瘤组织进行物理和/或酶解聚,及冷藏保存所述经解聚的肿瘤组织。

38. 一种冷藏保存的肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)的治疗性群体,其通过根据权利要求22至37中任意一项所述的方法获得。

39. 根据权利要求38所述的治疗性群体,其中所述群体包含约 5×10^9 个至 5×10^{10} 个T细胞。

40. 一种根据权利要求38或39所述的治疗性群体的冷藏保存袋。

41. 根据权利要求40所述的冷藏保存袋,其用于静脉输液。

42. 一种用于在封闭系统中制备肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)的治疗性群体的方法,包含:

(a) (i) 冷藏保存切除的肿瘤,并解聚该冷藏保存的肿瘤,或

(ii) 解聚切除的肿瘤,并冷藏保存该经解聚的肿瘤,或

(iii) 冷藏保存切除的肿瘤,并将所述肿瘤处理成多个肿瘤片段,或

(iv) 将切除的肿瘤处理成多个肿瘤片段,并冷藏保存所述肿瘤片段,

(b) 通过在包含IL-2的细胞培养基中培养冷藏保存的经解聚的肿瘤产物来进行第一扩增,以产生TIL的第一群体;

(c) 通过与额外的IL-2、OKT-3及抗原呈递细胞(APC)一起培养所述TIL的第一群体来进行第二扩增,以产生TIL的第二群体;以及

(d) 收集和/或冷藏保存所述TIL的第二群体。

43. 根据权利要求42所述的方法,其中所述解聚包含物理解聚、酶解聚或物理及酶解聚。

44. 根据权利要求42或43所述的方法,其中所述解聚包含向所述切除的肿瘤施加的重复的物理压力。

45. 根据权利要求42-44中任意一项所述的方法,其中所述解聚包含每分钟施加120至360次的高达 $6\text{N}/\text{cm}^2$,优选为 $3\text{N}/\text{cm}^2$ 的重复物理压力。

46. 根据权利要求42-45中任意一项所述的方法,其中所述物理解聚包含挤压及剪切。

47. 根据权利要求42-46中任意一项所述的方法,其中所述冷藏保存的经解聚的肿瘤产物包含单细胞悬浮液。

48. 根据权利要求42-47中任意一项所述的方法,其中解聚在适于酶消化的温度下进

行。

49. 根据权利要求42-48中任意一项所述的方法,其中冷藏保存包含将切除的或经解聚的肿瘤直接冷却至设定的冷藏保存温度。

50. 根据权利要求42-49中任意一项所述的方法,包含在受控温度装置中冷却所述切除的或经解聚的肿瘤,所述受控温度装置经程序化为以恒定速率降低温度。

51. 根据权利要求51所述的方法,其中所述冷藏保存温度为 $-80^{\circ}\text{C} \pm 10^{\circ}\text{C}$,且所述装置经程序化以 $1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 或 $1.5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 或 $2^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 或 $1^{\circ}\text{C}/\text{min} \pm 0.5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 或 $1^{\circ}\text{C}/\text{min} \pm 0.5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 或 $2^{\circ}\text{C}/\text{min} \pm 0.5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 来降低温度。

52. 一种从肿瘤组织中分离治疗性TIL群体的方法,所述肿瘤组织切除自对象,所述方法包含:

(a) 将切除的肿瘤组织置于用于所述肿瘤组织的半自动化无菌解聚的自动化装置中,所述自动化装置包含可程序化处理器和一次性无菌试剂盒,其中所述无菌试剂盒包含封闭系统;其中该无菌试剂盒包含:

用于接收及处理包含肿瘤组织的材料的解聚模块;

用于过滤解聚的固体组织材料及分离未解聚组织及滤液的、可选的富集模块;以及

用于可选地进一步处理和/或储存解聚的产物材料的稳定化模块,

其中每个所述模块包含一个或多个柔性容器,所述柔性容器通过一个或多个管道连接,所述管道适于使所述组织材料能够在其间流动;以及

其中每个所述模块包含一个或多个端口,以准许将培养基和/或试剂无菌输入至所述一个或多个柔性容器中;

(b) 无菌解聚所述切除的肿瘤,从而产生经解聚的肿瘤,

(c) 通过在包含IL-2的细胞培养基中培养所述经解聚的肿瘤来进行第一扩增,以产生UTIL的第一群体;

(d) 通过与额外的IL-2、OKT-3及抗原呈递细胞(APC)一起培养所述UTIL的第一群体来进行第二扩增,以产生UTIL的第二群体;以及

(f) 收集和/或冷藏保存所述UTIL的第二群体。

53. 根据权利要求32所述的方法,其中所述解聚包含向所述切除的肿瘤施加的重复的物理压力。

54. 根据权利要求52或53所述的方法,其中所述解聚包含每分钟施加120至360次的高达 $6\text{N}/\text{cm}^2$,优选为 $3\text{N}/\text{cm}^2$ 的重复物理压力。

55. 根据权利要求52-54中任意一项所述的方法,其中所述切除的肿瘤在解聚之前未经片段化。

56. 根据权利要求52-55中任意一项所述的方法,其中所述肿瘤组织未经浸渍。

57. 根据权利要求52-56中任意一项所述的方法,其中所述解聚进行90分钟或更短,或75分钟或更短,或60分钟或更短,或50分钟或更短。

58. 根据权利要求52-57中任意一项所述的方法,其中在步骤(b)之后,所述方法包含(b')在所述稳定化模块中冷藏保存所述经解聚的肿瘤。

59. 根据权利要求58中任意一项所述的方法,其中步骤(b')包含将所述经解聚的肿瘤产物直接冷却至所述冷藏保存温度。

60. 根据权利要求58所述的方法, 其中所述冷藏保存温度为 $-80^{\circ}\text{C} \pm 10^{\circ}\text{C}$, 且所述装置经程序化以 $1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 或 $1.5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 或 $2^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 或 $1^{\circ}\text{C}/\text{min} \pm 0.5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 或 $1^{\circ}\text{C}/\text{min} \pm 0.5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 或 $2^{\circ}\text{C}/\text{min} \pm 0.5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 来降低温度。

61. 根据权利要求52-60中任意一项所述的方法, 其中所述自动化装置进一步以任何组合包含以下的一个或多个:

传感器, 所述传感器能够在将所述经解聚的固体组织转移至所述可选的富集模块之前识别解聚过程是否已在所述解聚模块中完成;

重量传感器, 所述重量传感器测定所述解聚模块、所述富集模块和/或所述稳定化模块中的一个或多个的容器中所需的培养基的量, 并控制材料在各个容器之间的转移;

传感器, 所述传感器控制所述解聚模块、所述富集模块和/或所述稳定化模块中的一个或多个的容器中的温度;

至少一个气泡传感器, 所述气泡传感器控制培养基在模块中的各个容器的输入与输出端口之间的转移;

至少一个泵, 可选的蠕动泵, 以控制培养基在所述输入与输出端口之间的转移;

压力传感器, 其评估所述富集模块内的压力;

一个或多个阀, 其控制所述富集模块内的切向流过滤过程; 和/或

一个或多个夹具, 其控制培养基在各个模块的输入与输出端口之间的转移。

62. 根据权利要求52-61中任意一项所述的方法, 其中所述可程序化处理器控制所述解聚模块, 以使得能够进行所述固体组织材料的物理及酶分解, 和/或其中所述可程序化处理器控制所述稳定化模块, 以冷藏保存所述容器中富集的经解聚的固体组织。

63. 根据权利要求52-62中任意一项所述的方法, 其中所述解聚模块每分钟在高达 $6\text{N}/\text{cm}^2$, 优选为 $3\text{N}/\text{cm}^2$ 下重复挤压及剪切所述肿瘤组织120至360次, 且所述稳定化模块将所述经解聚的肿瘤组织冷却至 $-80^{\circ}\text{C} \pm 10^{\circ}\text{C}$, 且所述装置经程序化以 $1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 或 $1.5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 或 $2^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 或 $1^{\circ}\text{C}/\text{min} \pm 0.5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 或 $1^{\circ}\text{C}/\text{min} \pm 0.5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 或 $2^{\circ}\text{C}/\text{min} \pm 0.5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 来降低温度。

64. 一种适于在封闭系统中使用的柔性容器, 用于分离TIL的治疗群体以处理组织, 所述柔性容器包含:

由可密封聚合物制成的一层或多层, 其中所述柔性容器的至少三个边在制造期间被密封;

所述柔性容器上的一个开口边, 在使用期间, 所述组织材料通过所述开口边插入; 以及一个或多个连接器, 其配置为通过导管将所述柔性容器耦接于至少一个组件;

其中接近所述开口边的区段在组织材料置于所述柔性容器中后被密封, 以形成密封口。

65. 根据权利要求64所述的柔性容器, 其中使用在预定压力、预定温度及预定时间范围下操作的热封机形成所述密封口。

66. 根据权利要求64或65所述的柔性容器, 其中所述柔性容器被配置为与机械地挤压置于所述柔性容器中的组织材料的装置一起使用。

67. 根据权利要求64-66中任意一项所述的柔性容器, 其中所述柔性容器适于每分钟在至多 $6\text{N}/\text{cm}^2$, 优选为 $3\text{N}/\text{cm}^2$ 下重复施加物理压力120至360次。

68. 一种用于从肿瘤组织提取TIL的系统, 包含:

试剂盒,所述试剂盒包含:

解聚柔性容器;

稳定化柔性容器;以及

指示标签,所述指示标签位于所述解聚柔性容器或所述稳定化柔性容器中的至少一个上,其能够提供组织来源、所述组织的状态或识别符中的至少一个;

解聚组件,其能够在解聚柔性容器中处理至少一些组织,以形成经处理流体;

富集组件,其能够富集至少一些所述经处理流体,以形成所需材料;

稳定化组件,其能够将所述所需材料的一部分储存于所述稳定化柔性容器中,并可选地控制冷冻;以及

至少一个指示标签读取器,其位于所述解聚组件或所述稳定化组件中的至少一个上,其能够提供组织来源或所述稳定化组件处的该组织状态中的至少一个。

69. 一种治疗对象中的癌症的方法,包含:

(a) 无菌解聚从所述个体切除的肿瘤,从而产生经解聚的肿瘤产物,其中所述肿瘤已充分地解聚,使得所述经解聚的肿瘤产物可冷藏保存;

(b) 将所述经解聚的肿瘤产物冷却至适合的冷藏保存温度,

(c) 通过在包含IL-2的细胞培养基中培养冷藏保存的经解聚的肿瘤产物来进行第一扩增,以产生TIL的第一群体;

(d) 通过与额外的IL-2、OKT-3及抗原呈递细胞(APC)一起培养所述TIL的第一群体来进行第二扩增,以产生TIL的第二群体;

(e) 收集和/或冷藏保存所述TIL的第二群体;以及

(f) 向所述对象施用所述TIL的该第二群体;

其中所述解聚包含酶解聚和/或物理解聚,其中所述物理解聚包含向所述切除的肿瘤施加重复的物理压力;

其中步骤(a)至(e)在封闭系统中执行。

70. 根据权利要求69所述的方法,其中所述解聚包含每分钟施加120至360次的高达 $6\text{N}/\text{cm}^2$,优选为 $3\text{N}/\text{cm}^2$ 的重复物理压力。

71. 根据权利要求69或70所述的方法,其中所述经解聚的肿瘤产物包含单细胞悬浮液。

72. 根据权利要求69-71中任意一项所述的方法,其中所述切除的肿瘤在解聚之前未经片段化。

73. 根据权利要求69-72中任意一项所述的方法,其中步骤(a)在适于酶消化的温度下进行。

74. 根据权利要求69-72中任意一项所述的方法,其中步骤(b)包含将所述经解聚的肿瘤产物直接冷却至所述冷藏保存温度。

75. 根据权利要求69-74中任意一项所述的方法,其中解聚时间段为90分钟或更短,或75分钟或更短,或60分钟或更短,或50分钟或更短。

76. 根据权利要求69-75中任意一项所述的方法,其中所述解聚为连续的或以至少一分钟的时间段进行。

77. 根据权利要求69-76中任意一项所述的方法,其中所述肿瘤未经浸渍。

78. 根据权利要求69-77中任意一项所述的方法,包含在受控温度装置中冷却所述经解

聚的肿瘤产物,所述受控温度装置经程序化为以恒定速率降低温度。

79.根据权利要求78所述的方法,其中所述冷藏保存温度为 $-80^{\circ}\text{C}\pm 10^{\circ}\text{C}$,且所述装置经程序化以 $1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 或 $1.5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 或 $2^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 或 $1^{\circ}\text{C}/\text{min}\pm 0.5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 或 $1^{\circ}\text{C}/\text{min}\pm 0.5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 或 $2^{\circ}\text{C}/\text{min}\pm 0.5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 来降低温度。

80.根据权利要求69-79中任意一项所述的方法,其中所述TIL包含UTIL,或其中所述TIL包含MTIL。

81.根据权利要求69-80中任意一项所述的方法,其中所述TIL的第一群体为约100万至2000万个TIL。

82.根据权利要求69-81中任意一项所述的方法,其中步骤(c)包含生长TIL以产生所述第一群体,且步骤(d)的所述第二扩增包含快速扩增。

83.根据权利要求69-82中任意一项所述的方法,其中步骤(c)进行约两周,且步骤(d)进行约两周。

84.根据权利要求69-83中任意一项所述的方法,其中步骤(c)和/或步骤(d)中的培养包括添加IL-7、IL-12、IL-15、IL-18、IL-21或其组合。

85.根据权利要求69-84中任意一项所述的方法,包含将切除的肿瘤组织置于具有解聚流体的柔性容器中、密封所述容器、使所述肿瘤组织进行物理和/或酶解聚,及冷藏保存所述经解聚的肿瘤组织。

86.根据权利要求69-85中任意一项所述的方法,其中所述TIL的该第二群体包含约 5×10^9 至 5×10^{10} 个T细胞。

87.根据权利要求69-86中任意一项所述的方法,其中所述癌症为膀胱癌、乳腺癌、由人乳头瘤病毒引起的癌症、子宫颈癌、头颈癌(包括头颈部鳞状细胞癌(head and neck squamous cell carcinoma;HNSCC)、肺癌、黑色素瘤、卵巢癌、非小细胞肺癌(non-small-cell lung cancer;NSCLC)、肾癌或肾细胞癌。

用于分离肿瘤浸润淋巴细胞的装置及方法及其用途

相关申请和引用并入

[0001] 本申请要求2019年12月20日提交的美国专利申请第62/951,559号、2020年2月27日提交的美国专利申请第62/982,470号、2020年7月2日提交的美国专利申请第29/740,293号和2020年7月2日提交的美国专利申请第63/047,431号的权益,这些申请各自以全文引用的方式并入本文中。

[0002] 参考2017年1月13日提交的英国专利申请序列号GB1700621.4、2018年1月12日提交的欧洲专利申请EP18701791.8、2018年1月12日提交的国际专利申请序列号PCT/GB2018/050088,其于2018年7月19日以PCT公开号W0 2018/130845公开、欧洲专利公开号:EP3568459,和2019年12月20日提交的美国专利申请序列号62/951,559,在此并入作为参考。

[0003] 参考2019年3月1日提交的英国专利申请序列号GB1902763.0、2019年3月27日提交的英国专利申请序列号GB1904249.8和2020年2月28日提交的国际专利申请序列号PCT/EP2020/000053,其于2020年9月10日以W0 2020/177920公开。

[0004] 前述申请:《肿瘤浸润淋巴细胞治疗的生物标记物预测及其用途》,W02019145711A1、PCT/GB2019/050188;《肿瘤浸润淋巴细胞疗法及其用途》,PCT/GB2020/051790、美国申请序列号62/878,001;《为过继细胞治疗提供靶向共刺激的受体》,W0 2020/152451、美国申请序列号62/951,770,和GB1900858.0;《表达重组生长因子受体的细胞》(Cells Expressing Recombinant Growth Factor Receptors),W0 2017/103596A1、美国申请序列号16/061,435和欧洲专利公开号EP3390436;以及《嵌合生长因子受体》,W02019243835A1、PCT/GB2019/051745,以及其中引用或在其审查期间引用的所有文件(“申请引用的文件”)和引用的申请中援引或引用的所有文件,以及本文援引或引用的所有文件(“本文引用的文件”),以及本文引用的文件中引用或援引的所有文件,连同任何制造商的说明、描述、产品规格和本文或通过引用并入本文的任何文件中提及的任何产品的产品说明书皆通过引用并入本文,并且可以在本发明的实践中使用。更具体地,所有引用的文件都以引用的方式并入,如同每个单独的文件被具体和单独地指出以引用的方式并入一样。

技术领域

[0005] 本发明提供了用于通过对肿瘤进行半自动无菌组织处理,从切除的肿瘤中分离和冷冻肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)并由此产生TIL的治疗性群体的方法和装置。

背景技术

[0006] T细胞衍生自驻留于骨髓中但随后迁移至胸腺中且在胸腺中成熟的造血干细胞。在成熟过程期间,T细胞经历一系列选择事件,从而产生多样化T细胞库。随后,这些细胞被释放至外周循环中,以执行其作为后天免疫系统的一部分的特定功能。

[0007] T细胞并非均质细胞群,而是由许多谱系构成,其中主要的类型由两种另外的细胞标记物的表现所定义。表达CD4的T细胞一般称为辅助细胞(Th),且被认为通过细胞-细胞接

触及通过产生被称为细胞因子的介体分子 (mediator molecules) 来协调免疫系统的许多功能。CD8 T细胞被视为具有细胞毒性 (Tc), 且被认为是执行目标细胞的直接杀灭的细胞。这些活性均经由T细胞受体/抗原/MHC相互作用来控制——因此, 在成功识别目标细胞上的肽/MHC后, CD4及CD8细胞通过细胞因子的产生和细胞毒性活性协同起作用以消除目标细胞, 包括感染的病毒及肿瘤细胞。

[0008] T细胞并不识别完整蛋白质 (抗原), 但对通过被称为主要组织相容性复合体 (MHC) 的特定蛋白质呈现于目标细胞的表面上的短蛋白质片段起反应。在成熟过程期间, T细胞在其细胞表面上表现抗原特异性T细胞受体 (TCR), 其识别由MHC分子呈现的这些短蛋白质 (肽) 抗原。因此, 仅当正确的肽呈现于与正确MHC分子相关的目标细胞表面上时, T细胞才会激活其免疫功能。因此, 肿瘤特异性T细胞的出现频率在肿瘤中富集, 使得其成为肿瘤特异性T细胞 (即肿瘤浸润淋巴细胞 (TIL)) 的理想来源 (Andersen等人, Cancer Res. 2012年4月1日; 72 (7): 1642-50. doi:10.1158/0008-5472.CAN-11-2614. Epub 2012年2月6日)。

[0009] 当然, 这是高度简化的描述, 且代表对T细胞功能的简短概述。后天性免疫反应不单独起作用, 而是需要与一系列免疫及非免疫细胞广泛相互作用, 以促进T细胞高效运输至所需的活性位点, 以确保引发正确的免疫反应、该免疫反应得到控制, 并不再需要之后停止该免疫反应。因此, 即使在所制造的TIL引发针对肿瘤的免疫反应的患者中, 其随后可被患者自身的免疫系统及肿瘤环境支持或减弱。

[0010] 肿瘤特异性TIL为从患有转移癌的患者肿瘤分离的T细胞。在大多数癌症患者中, 血液中几乎不能检测到循环肿瘤特异性T细胞。然而, 某些癌症, 例如皮肤黑色素瘤, 似乎具有免疫原性, 因为其在肿瘤生长的自然过程期间, 尤其在肿瘤区域内具有诱发显著数目的具有抗肿瘤活性的T细胞的能力 (Muul等人, J Immunol. 1987年2月1日; 138 (3): 989-95)。“选择为对肿瘤具有特异性的T细胞”的肿瘤反应性T细胞可从肿瘤材料中分离且离体扩增成高数目。报导已展示这种细胞含有抗肿瘤反应性, 其可在再输注至患者中时引起肿瘤破坏及临床反应 (Dudley等人, Science. 2002年10月25日; 298 (5594): 850-4. Epub 2002年9月19日)。在后续试验中, 确认了T细胞特征的重要性的“年轻的”快速生长细胞“年轻TIL”的益处, 从而根本“不针对特异性选择”细胞。值得注意地, 这产生了约50%的TIL或CD8选定的TIL中的极佳反应率 (Besser等人, Anticancer Res. 2009年1月; 29 (1): 145-54; Dudley等人, Clin Cancer Res. 2010年12月15日; 16 (24): 6122-31. doi:10.1158/1078-0432.CCR-10-1297. Epub 2010年7月28日)。

[0011] Andersen等人 (Cancer Res. 2012年4月1日; 72 (7): 1642-50. doi:10.1158/0008-5472.CAN-11-2614. Epub 2012年2月6日) 的研究鉴别出: 相比于外周血中的T细胞, 肿瘤内富集黑色素瘤特异性T细胞 (对于已知癌症抗原)。这一发现支持以下学说: 当与使用从外周血分离的T细胞且在类似含量的IL2中或仅静脉内IL-2中扩增的黑色素瘤患者中的早期试验相比时, 经分离的TIL群体为引起增强的抗肿瘤活性的富集的肿瘤特异性T细胞 (LAK细胞——Bordignon等人, Haematologica. 1999年12月; 84 (12): 1110-49)。

[0012] 美国专利第10,398,734号涉及用于扩增TIL及产生TIL的治疗性群体的方法。’734专利的肿瘤作为本体肿瘤 (bulk tumor) 运送, 且大块肿瘤内部的TIL快速变得缺氧且随时间推移逐渐劣化。’734专利的肿瘤也被处理成具有劣化的内部细胞群体的片段。此外, 用于制造的TIL将仅为从组织片段扩增的TIL, 而不为任何保留在内部的TIL。因此, 所得细胞群

体可能不会反映肿瘤环境的完全多样性。

[0013] 收集TIL需要在培养及扩增TIL群体之前将作为大块肿瘤的固体组织无菌解聚(disaggregation)。固体组织解聚期间的条件及收集细胞所花费的时间对最终细胞化材料的存活率及回收率具有实质性影响。使用常规方法获得的固体组织来源的细胞悬浮液通常包括广泛多种不同的细胞类型、解聚培养基、组织碎片和/或流体。这可能需要使用选择性靶向和/或分离细胞类型,例如在制造再生药品、过继细胞疗法、ATMP、诊断性活体外研究和/或科学研究之前。

[0014] 目前,选择或富集技术一般利用以下之一:大小、形状、密度、黏附性、强蛋白质-蛋白质相互作用(亦即抗体-抗原相互作用)。举例而言,在一些情况下,选择可通过提供生长支持环境和通过控制培养条件或与半永久或永久耦合至磁性或非磁性固相或半固相底物相关的更复杂细胞标记物相互作用进行。

[0015] 对于富集、分离或选择,可使用任何分选技术,例如,亲和色谱法或本领域中已知的任何其它抗体依赖性分离技术。本领域中已知的任何配体依赖性分离技术可与依赖于细胞的物理特性的正及负分离技术结合使用。尤其有效的分选技术为磁性细胞分选。以磁性方式分离细胞的方法可商购自例如Thermo Fisher、Miltenyi Biotec、Stemcell Technologies、Cellpro Seattle、Advanced Magnetix、Boston Scientific或Quad Technologies。举例而言,单克隆抗体可与磁性聚苯乙烯粒子(如Dynal M 450或类似磁性粒子)直接耦合且用于例如细胞分离。Dynabeads磁珠技术并非基于管柱,而是这些磁性珠粒与附着的细胞在样品管中具有液相动力学,且通过将管置放于磁性支架上来分离细胞。

[0016] 从样品富集、分选和/或侦测细胞包括使用单克隆抗体以及具有例如多糖的有机涂层的胶态超顺磁微粒(例如磁活化细胞分选(MACS)技术(Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany))。粒子(例如纳米粒子或微米粒子(MicroBeads))可与单克隆抗体直接结合或与抗免疫球蛋白、抗生物素蛋白或抗半抗原特异性微米粒子组合使用,或涂布具有选择性结合特性的其它哺乳动物分子。

[0017] 如上文所述的磁性粒子选择技术通过将细胞与涂布有针对特定表面标记物的抗体或其他部分(moieties)的磁性纳米粒子一起培育,而使细胞正或负分离。这使得表达该标记物的细胞附着至磁性纳米粒子。之后,将细胞溶液置于强磁场中的固体或柔性容器内。在此步骤中,细胞附着至纳米粒子(表达标记物)且保持在管柱上,而其靶细胞(不表达标记物)流动通过。利用此方法,细胞可相对于特定标记物正或负分离。

[0018] 在正选择的情况下,在自磁场移出管柱之后,将附着至磁性管柱的表达感兴趣的标记物的细胞洗出至另外的容器中。

[0019] 在负选择的情况下,将所使用的抗体或选择性部分针对已知存在于不感兴趣的细胞上的表面标记物。在将细胞/磁性纳米粒子溶液施加至管柱上之后,表达这些抗原的细胞结合至管柱,而通过的部分因含有感兴趣的细胞而被收集。由于这些细胞未经耦合至纳米粒子的选择性抗体或部分标记,因此其“未改变”。已知的人工或半自动化固体组织处理步骤为劳力密集的且需要本领域的知识。

[0020] 另外,当材料用于治疗目的时,该过程在细胞培养操作期间需要严格控制的环境条件,例如作为解聚、酶消化及转移至储存装置中的一部分或在其之前的组织处理,和严格控制的用于解聚/细胞化及活组织产率的培养条件。通常,此过程将需要多件实验室及组织

处理设备,及具有科学领域的技能及知识的人员,其中关键阶段位于危险控制区或组织处理设施无菌环境下,以便安全地进行相同活动,并使污染风险最小化。

[0021] 来自组织的所需产物的存活率及回收率可受在组织收集、解聚及细胞收集期间的条件影响。本发明起因于提供改良的组织处理的需求,包括进行实现上述未满足需求的所述过程的装置/设备。

[0022] 本申请案中的任何文献的引用或识别并非承认此类文献可用作本发明的现有技术。

发明内容

[0023] 本发明涉及一种分离肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)的治疗性群体的方法,其可包含:

(a) 从对象切除肿瘤;

(b) 将切除的肿瘤储存于一次性无菌试剂盒中,其中该无菌试剂盒包含:

用于接收及处理包含固体哺乳动物组织的材料的解聚模块;

用于过滤解聚的固体组织材料及分离未解聚组织及滤液的可选的富集模块;以及

用于可选地进一步处理和/或储存解聚的产物材料的稳定化模块,

其中每个模块包含一个或多个柔性容器,该一个或多个柔性容器通过一个或多个管道连接,所述管道适于使该组织材料能够在其间流动;以及

其中每个模块包含一个或多个端口,以准许将培养基和/或试剂无菌输入至所述一个或多个柔性容器中;

(c) 在解聚模块中无菌解聚切除的肿瘤,从而产生经解聚的肿瘤;

(d) 通过在包含IL-2的细胞培养基中培养经解聚的肿瘤来进行第一扩增,以产生UTIL的第一群体;

(e) 通过与额外的IL-2、OKT-3及抗原呈递细胞(APC)一起培养UTIL的第一群体来进行第二扩增,以产生TIL的第二群体;

(f) 收集和/或冷藏保存UTIL的第二群体。在一些实施例中,步骤a)为可选的。

[0024] 本发明涉及一种分离冷藏保存的肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)的治疗性群体的方法,其可包含:

(a) 从对象切除肿瘤;

(b) 将切除的肿瘤储存于一次性无菌试剂盒中,其中该无菌试剂盒包含:

用于接收及处理包含固体哺乳动物组织的材料的解聚模块;

用于过滤解聚的固体组织材料及分离未解聚组织及滤液的可选的富集模块;以及

用于可选地进一步处理和/或储存解聚的产物材料的稳定化模块,

其中每个模块包含一个或多个柔性容器,该柔性容器通过一个或多个管道连接,所述管道适于使所述组织材料能够在其间流动;以及

其中每个模块包含一个或多个端口,以准许将培养基和/或试剂无菌输入至所述一个或多个柔性容器中;

(c) 在解聚模块中无菌解聚切除的肿瘤,从而产生解聚肿瘤,其中若切除的肿瘤可在最少细胞损伤下冷藏保存,则充分解聚;

(d) 在稳定化模块中冷藏保存经解聚的肿瘤;

(e) 通过在包含IL-2的细胞培养基中培养所述经解聚的肿瘤来进行第一扩增,以产生UTIL的第一群体;

(f) 通过与额外的IL-2、OKT-3及抗原呈递细胞(APC)一起培养UTIL的第一群体来进行第二扩增,以产生TIL的第二群体;

(g) 收集和/或冷藏保存UTIL的第二群体。在一些实施例中,步骤a)为可选的。

[0025] 解聚可包含物理解聚、酶解聚或物理及酶解聚。在一个有利的实施例中,经解聚的肿瘤被细胞化或纯化。

[0026] 在本发明中,互相连接且具有特定的独立功能的容器组维持无菌的封闭系统以进行处理,可选地富集但稳定化经解聚的和细胞化的肿瘤。基本上,本发明提供一种快速预灭菌环境,以最小化对切除的肿瘤的处理期间所需的时间及污染风险或操作员暴露。

[0027] 相较于标准非封闭组织处理,无菌试剂盒允许封闭的固体组织处理,消除最终细胞化产物的污染风险,尤其当在组织获取/获得地点内进行该过程,且需要在最终细胞处理之前储存以达到其最终用途时。此外,由于与可含有感染性生物体(例如病毒)的生物有害材料的直接接触减少,操作员的安全性增加。该试剂盒也使得所有或一部分最终经处理的细胞化材料能够在经处理以达到其最终用途之前被稳定化以输送或储存。

[0028] 本发明将使得切除的肿瘤能够在切除时或随后视需要被处理,而不影响细胞化肿瘤的获取程序或存活率。

[0029] 在一些实施例中,可选地通过物理纯化形式进行富集以减少杂质,例如不再需要的试剂;细胞碎片;未解聚的肿瘤组织及脂肪。出于此目的,无菌试剂盒在稳定化之前可具有可选的富集模块。可通过排除小于5 μ m的粒子及流体或约200 μ m或更大的不完全解聚材料来富集单个细胞或小细胞数目聚集体,以在解聚之后稳定化,但这将根据组织和解聚效率而变化,且取决于组织或解聚肿瘤的最终用途,可采用呈组织特异性试剂盒形式的各种实施例。

[0030] 在另一个实施例中,在步骤(c)之后提供单细胞悬浮液。

[0031] 在另一个实施例中,UTIL的第一群体需要约100万至2000万个UTIL。

[0032] 在另一个实施例中,步骤(e)可进一步包含从切除的肿瘤起始材料生长出UTIL,随后是步骤(f)的快速扩增。

[0033] 在另一个实施例中,步骤(e)可进行约两周且步骤(f)可进行约两周。

[0034] 在另一个实施例中,额外的步骤(h)涉及悬浮UTIL的第二群体。悬浮可在缓冲盐水、人类血清白蛋白和/或二甲亚砜(DMSO)中。

[0035] 本发明亦也包含通过本文所公开的任意方法所获得的冷藏保存的UTIL的治疗性群体。治疗性群体可包含约 5×10^9 至 5×10^{10} 个T细胞。

[0036] 本发明还包含本文所公开的治疗性群体的冷藏保存袋。该冷藏保存袋可用于静脉输液。

[0037] 本发明还包含一种治疗癌症的方法,其可包含施用本文所公开的治疗性群体或本文所公开的冷藏保存袋。本发明还公开本文公开的治疗性群体、医药组合物或冷藏保存袋,其用于治疗癌症。该癌症可为膀胱癌、乳腺癌、由人乳头瘤病毒引起的癌症、子宫颈癌、头颈癌(包括头颈部鳞状细胞癌(HNSCC)、肺癌、黑色素瘤、卵巢癌、非小细胞肺癌(NSCLC)、肾癌或肾细胞癌。

[0038] 在另一个实施例中,无菌试剂盒的一个或多个柔性容器包含弹性可变形材料。

[0039] 在另一个实施例中,无菌试剂盒的解聚模块的一个或多个柔性容器包含一个或多个可密封开口。解聚模块和/或稳定化模块的一个或多个柔性容器也可包含可热封熔接口(heat sealable weld)。

[0040] 在另一个实施例中,无菌试剂盒的一个或多个柔性容器包含内部圆形边缘。

[0041] 在另一个实施例中,无菌试剂盒的解聚模块的一个或多个柔性容器包含适于以机械地挤压及剪切其中的实体肿瘤的解聚表面。

[0042] 在另一个实施例中,无菌试剂盒的富集模块的一个或多个柔性容器包含保留细胞化解聚实体肿瘤的保留物的过滤器。

[0043] 在另一个实施例中,无菌试剂盒的稳定化模块的一个或多个柔性容器包含用于将活细胞储存为溶液形式或冷藏保存状态下的培养基制剂。

[0044] 在另一个实施例中,无菌试剂盒进一步包含数码、电子或电磁标签识别符。标签识别符可涉及一种特定程序,其定义一种类型的解聚和/或富集和/或稳定化过程,在这些过程中使用的一或多种类型的培养基,包括适于受控速率冷冻的可选的冷冻溶液。

[0045] 在另一个实施例中,相同的柔性容器可形成解聚模块、稳定化模块及可选的富集模块中的一个或多个的一部分。

[0046] 在另一个实施例中,无菌试剂盒的解聚模块包含用于接收待处理的组织的第一柔性容器。

[0047] 在另一个实施例中,无菌试剂盒的解聚模块包含第二柔性容器,其包含用于解聚的培养基。

[0048] 在另一个实施例中,无菌试剂盒的可选的富集模块包含第一柔性容器及用于接收富集的滤液的第三柔性容器。

[0049] 在另一个实施例中,无菌试剂盒的解聚模块及稳定化模块均包含第二柔性容器,且第二柔性容器包含消化培养基及稳定化培养基。

[0050] 在另一个实施例中,无菌试剂盒的稳定化模块包含第四柔性容器,其包含稳定化培养基。

[0051] 在另一个实施例中,无菌试剂盒的稳定化模块还包含用于储存和/或经历冷藏保存的第一柔性容器和/或第三柔性容器。

[0052] 本发明还提供一种分离冷藏保存的UTIL的治疗性群体的方法,其包含

(a) 从对象切除肿瘤;

(b) 将切除的肿瘤储存于一次性无菌试剂盒中,其中该无菌试剂盒包含:

用于接收及处理包含固体哺乳动物组织的材料的解聚模块;

用于过滤解聚的固体组织材料及分离未解聚组织及滤液的可选的富集模块;以及

用于可选地进一步处理和/或储存解聚的产物材料的稳定化模块,

其中每个模块包含一个或多个柔性容器,所述柔性容器通过一个或多个管道连接,所述管道适于使所述组织材料能够在其间流动;以及

其中每个所述模块包含一个或多个端口,以准许将培养基和/或试剂无菌输入至所述一个或多个柔性容器中;

(c) 在解聚模块中无菌解聚切除的肿瘤,从而产生经解聚的肿瘤,其中若切除的肿

瘤可在无细胞损伤下冷藏保存,则充分解聚;

(d) 在稳定化模块中冷藏保存经解聚的肿瘤;

(e) 通过在包含IL-2的细胞培养基中培养所述经解聚的肿瘤来进行第一扩增,以产生UTIL的第一群体;

(f) 通过与额外的IL-2、OKT-3及抗原呈递细胞(APC)一起培养所述UTIL的第一群体来进行第二扩增,以产生TIL的第二群体;以及

(g) 收集和/或冷藏保存UTIL的第二群体。在一些实施例中,步骤a)为可选的。

[0053] 在另一个实施例中,自动化装置进一步包含用于识别无菌试剂盒的射频鉴别标签读取器,使得无菌试剂盒可在自动化处理期间(例如在本发明的实施例中的自动化装置内)被扫描及识别。关键地,标签提供关于自动处理所需的条件及步骤的信息,因此简单地通过扫描试剂盒,与试剂盒一起使用以处理组织的任何自动化系统可在无进一步干预或污染的情况下运行。在已将组织样品置放于解聚模块中后,其可例如在处理开始之前人工地或自动地密封。

[0054] 自动化装置的可程序化处理器也可通过标签识别无菌试剂盒,且随后可执行试剂盒程序,所述试剂盒程序定义解聚、富集及稳定化过程的类型及这些过程所需的相应培养基类型,其包括适用于受控速率冷冻的可选的冷冻溶液。自动化装置的可程序化处理器适于与以下通信且控制以下:解聚模块、富集模块,和/或稳定化模块。换言之,试剂盒因此可被自动化装置读取,该装置用于执行特定全自动方法,以在插入此类装置中时处理肿瘤。

[0055] 自动化装置的可程序化处理器可控制解聚模块,以使得能够物理和/或生物分解固体组织材料。此分解可为固体组织材料的物理或酶分解。可通过培养基酶溶液进行固体组织材料的酶分解,所述培养基酶溶液为选自胶原蛋白酶、胰蛋白酶、脂肪酶、玻尿酸酶、脱氧核糖核酸酶、Liberase HI、胃蛋白酶及其混合物组成的组中的一种或多种。

[0056] 在另一个实施例中,可程序化处理器控制解聚柔性容器内的解聚表面,其机械地挤压及剪切固体组织。在一些实施例中,解聚表面受机械活塞控制。

[0057] 在另一个实施例中,可程序化处理器控制稳定化模块以冷藏保存容器中的富集的解聚固体组织。此可使用可程序化温度设定来达成,该可程序化温度设定为通过读取插入装置中的试剂盒的标签所确定的条件。

[0058] 在另一个实施例中,为进行过程的不同功能,提供装置和/或试剂盒的额外组件中的一个或多个,且可以任何组合使用。此可包括:传感器,其能够在将解聚的固体组织转移至可选的富集模块之前识别解聚过程是否已在解聚模块中完成;重量传感器,其测定解聚模块、富集模块和/或稳定化模块中的一个或多个的容器中所需的培养基的量,并控制材料在各容器之间的转移;传感器,其控制解聚模块、富集模块和/或稳定化模块中的一个或多个的容器内的温度;至少一个气泡传感器,其控制培养基在模块中的各容器的输入与输出端口之间的转移;至少一个泵,可选为蠕动泵,其控制培养基在输入与输出端口之间的转移;压力传感器,其评估富集模块内的压力;一个或多个阀控制富集模块内的切向流过滤过程;和/或一个或多个夹具,其控制培养基在各模块的输入与输出端口之间的转移。

[0059] 在另一个实施例中,自动化装置的可程序化处理器适于维持稳定化模块中的最佳储存温度范围,直至容器被移走;或执行受控的冷冻步骤。这允许UTIL在其最终用途之前储存较短的时间段(数分钟至数天)或储存较长的时间段(数天至数年),取决于与稳定化模块

一起使用的类型或稳定化过程。

[0060] 在另一个实施例中,自动化装置进一步包含用户接口。接口可包含用以显示指令的显示屏,该指令指导用户输入参数、确认预程序化的步骤、警告错误或其组合。

[0061] 在另一个实施例中,自动化装置经调适成可移动的且因此可包含允许容易操纵和/或辅助移动的维度,诸如车轮、轮胎和/或把手。

[0062] 本发明还提供一种用于分离冷藏保存的UTIL的治疗性群体的半自动无菌组织处理方法,其包含以下步骤:

(a) 从与无菌处理试剂盒相关的数码、电子或电磁标签识别符自动确定无菌解聚组织处理步骤及其相关条件,其中无菌试剂盒包含:

用于接收及处理包含固体哺乳动物组织的材料的解聚模块;

用于过滤解聚发固体组织材料及分离未解聚组织及滤液的可选的富集模块;以及

用于可选地进一步处理和/或储存解聚的产物材料稳定化模块,其中每个模块包含一个或多个柔性容器,所述柔性容器通过一个或多个管道连接,所述管道适于使所述组织材料能够在其间流动;以及

其中每个模块包含一个或多个端口,以准许将培养基和/或试剂无菌输入至所述一个或多个柔性容器中;

(b) 从对象切除肿瘤;

(c) 将肿瘤置放于无菌试剂盒的解聚模块的柔性塑料容器中;

(d) 通过与以下通信且控制以下,自动执行一个或多个组织处理步骤来处理肿瘤:

解聚模块;其中无菌解聚切除的肿瘤,从而产生经解聚的肿瘤,其中若切除的肿瘤可在无细胞损伤下冷藏保存,则充分解聚;

可选的富集模块,其中过滤经解聚的肿瘤以移除解聚的固体组织材料及分离未解聚的组织及滤液;

稳定化模块,其中冷藏保存经解聚的肿瘤;

(e) 通过在包含IL-2的细胞培养基中培养经解聚的肿瘤来进行第一扩增,以产生UTIL的第一群体;

(f) 通过与额外的IL-2、OKT-3及抗原呈递细胞(APC)一起培养UTIL的第一群体来进行第二扩增,以产生TIL的第二群体;

(g) 收集和/或冷藏保存UTIL的第二群体。在一些实施例中,步骤b)为可选的。

[0063] 柔性容器(诸如袋)可用于处理组织材料。处理可包括可分离或分解组织的处理,例如物理分解可通过搅拌(例如平缓搅拌)实现,生物和/或酶分解可包括酶消化,和/或提取袋中组织材料的组分。

[0064] 用于处理组织的柔性容器(例如袋)可包括一个或多个由可密封聚合物制成的层,其具有至少三个在制造期间密封的柔性容器边缘及在使用期间插入组织材料的柔性容器上的开口边。一个或多个连接器可用于通过导管将柔性容器耦接于至少一个组件。在将组织置放于柔性容器之后,可密封或熔接接近开口边的柔性容器的部分,以形成密封口。密封口可具有至少3mm的宽度,且实质上平行于开口边安置,并与柔性容器的开口边相间隔。在一些情况下,密封口可具有大于约5mm的宽度。举例而言,袋可在组织置放于内部之后经密封,以具有位于接近袋的开口边的至少5mm的密封口。密封口可平行于开口边且与袋的开

口边相间隔。

[0065] 柔性容器可使用具有突起、接近密封口安置,且相较于密封口进一步与柔性容器的开口边相间隔的夹具进一步紧固。

[0066] 在一些情况下,密封口及柔性容器经构筑使得柔性容器可耐受在使用期间施加至柔性容器的100N的力。在一些情况下,取决于所使用材料的类型和/或密封口的结构,使用与此类密封口结合的夹具可为有利的。因此,在柔性容器(例如袋)的使用期间,密封口与夹具的组合可能能够承受施加至柔性容器的100N力。

[0067] 在一些情况下,密封口及柔性容器经构筑使得柔性容器可耐受在使用期间施加至柔性容器的75N力。在一些情况下,取决于所使用材料的类型和/或密封口的结构,使用与此类密封口结合的夹具可为有利的。因此,在柔性容器(例如袋)的使用期间,密封口与夹具的组合可能能够承受施加至柔性容器的75N力。

[0068] 柔性容器可用于在处理(例如组织材料的解聚)期间容纳组织。

[0069] 在一些实施例中,柔性容器(例如袋)可用于解聚组织材料、过滤解聚组织材料和/或分离未解聚组织和滤液。

[0070] 柔性容器(例如袋)可由弹性可变形材料形成。可针对一种或多种特性选择供用于柔性容器(例如袋)的材料,所述特性包括但不限于密封性(诸如归因于热熔接或使用射频能量的密封性)、透气性、柔性(例如低温柔性(例如在-150℃或-195℃下))、弹性(例如低温弹性)、耐化学性、光学透明度、生物兼容性(诸如细胞毒性)、溶血性活性、抗浸出性、具有低微粒、针对特定气体(例如氧气和/或二氧化碳)的高传输速率和/或遵从监管要求。

[0071] 柔性容器(例如袋)可包括指示符。指示符可用于鉴别样品、样品所来源的患者和/或追踪在处理过程中特定样品的进展。在一些情况下,指示符可由自动化或半自动化系统扫描以追踪样品的进展。

[0072] 可在柔性容器(例如袋)上使用标记以识别袋应在何处置放、处理、密封或可关于对包含组织的袋采取的任何其它动作。各个袋可包括用于密封的多个标记。

[0073] 袋的开口端可在组织插入袋中之后密封。可使用在预定压力、预定温度及预定时间范围下操作的密封装置(例如加热密封机)形成任何密封口。

[0074] 在一些情况下,柔性容器(例如袋)可用作解聚容器,以作为还可包括解聚装置的解聚组件的一部分。在一些实施例中,可将培养基和/或酶添加至装置的解聚组件内的袋中。举例而言,袋可与机械地挤压置放于柔性容器中的组织材料的装置一起使用。

[0075] 在一些实施例中,可在解聚期间剪切柔性容器(例如袋)中的组织。尤其地,柔性容器可构造为剪切组织材料。

[0076] 柔性容器可用于半自动化或自动化过程以用于哺乳动物细胞或细胞聚集体的无菌解聚、稳定化和/或可选的富集。

[0077] 用于从组织提取所需材料的试剂盒可包括解聚组件,其中至少一些组织经处理以形成经处理流体;富集组件(例如过滤器),其能够富集至少一些经处理流体中以形成所需材料;稳定化组件,其能够储存一部分的所需材料;及位于解聚组件、富集组件或稳定化组件中的至少一个上的指示标签,其能够提供组织来源、组织相对于过程的状态或识别符中的至少一个。

[0078] 所需材料可为特定大小的生物材料或组分。例如,所需材料可为肿瘤浸润淋巴细

胞 (TIL)。

[0079] 不同类型的培养基可用于由解聚组件及稳定化组件进行的各种过程中。举例而言,可向试剂盒提供冷藏保存培养基,并将其用于稳定化组件中以控制冷冻速率。

[0080] 用于其中解聚组件可包括第一柔性容器且稳定化组件可包括第二柔性容器的装置中的试剂盒。

[0081] 用于来自哺乳动物固体组织的细胞或细胞聚集体的半自动化无菌解聚和/或富集和/或稳定化的自动化装置可包括可程序化处理器及包括本文所描述的柔性容器的试剂盒。自动化装置可进一步包括指示标签读取器。例如,指示标签读取器可安置在任何组件处(例如试剂盒中的组织材料的解聚、富集或稳定化)。

[0082] 在一些情况下,自动化装置可进一步包括射频鉴别标签读取器以识别试剂盒中的柔性容器中的样品。

[0083] 自动化装置可包括可程序化处理器,该可程序化处理器能够通过指示标签(例如QR码)识别定位于试剂盒的组件(例如袋)上的指示符。在确定何种样品在袋中之后,可程序化处理器随后执行定义解聚、富集及稳定化过程类型及那些过程所需的各个培养基类型的程序。

[0084] 用于自动化装置的试剂盒可包括解聚柔性容器或袋。可程序化处理器可控制解聚元件及解聚柔性容器以使得能够物理和/或生物分解固体组织。

[0085] 可程序化处理器可控制自动化装置的元件,使得位于接近于解聚柔性容器的解聚表面可机械地挤压及剪切解聚柔性容器中的固体组织,可选地,其中解聚表面为机械活塞。

[0086] 系统的解聚组件可由处理器控制,使得解聚柔性容器中的组织能够实现固体组织的物理及酶分解。可将选自胶原蛋白酶、胰蛋白酶、脂肪酶、玻尿酸酶、脱氧核糖核酸酶、Liberase HI、胃蛋白酶或其混合物的一种或多种培养基酶溶液提供至解聚柔性容器以帮助组织的酶分解。

[0087] 系统可包括试剂盒,该试剂盒包括解聚柔性容器及稳定化柔性容器及可程序化处理器。可程序化处理器可经调适以控制以下中的一个或多个:解聚组件;富集组件;及稳定化组件。

[0088] 可程序化处理器可控制稳定化组件以冷藏保存稳定化容器中的富集解聚固体组织。在一些实施例中,可程序化预定温度。

[0089] 自动化装置包括多个组合的额外组件。组件可包括传感器,其能够在将解聚的固体组织转移至可选的富集组件之前识别解聚过程是否已在解聚模块中完成;重量传感器,其测定解聚组件、富集组件和/或稳定化组件中的一个或多个的容器中所需的培养基的量,且控制材料在各容器之间的转移;传感器,其控制解聚组件、富集组件和/或稳定化组件中的一个或多个的容器内的温度;至少一个气泡传感器,其控制培养基在元件中的各容器的输入与输出端口之间的转移;至少一个泵,可选为蠕动泵,其控制培养基在输入与输出端口之间的转移;评估富集元件内的压力的压力传感器;控制富集元件内的切向流过滤过程的一个或多个阀;和/或控制培养基在各元件的输入与输出端口之间的转移的一个或多个夹具。

[0090] 自动化装置可包括可程序化处理器,其适于维持稳定化模块中的最佳储存温度范围,直至容器被移走。在一个实施例中,可程序化处理器可执行受控冷冻步骤。

[0091] 在一些情况下,自动化装置可包括用户接口。自动化装置的接口可包括用以显示指令的显示屏,该指令指导用户输入参数、确认预程序化的步骤、警告错误或其组合。

[0092] 如本文所描述的自动化装置可经调适成可移动的。

[0093] 自动组织处理方法可以包括通过与试剂盒的组件相关的数码、电子或电磁标签指示符自动确定用于处理步骤的条件及其相关条件。在使用期间,可将组织样品置放于试剂盒的具有至少一个开口边的柔性容器中。在将组织定位于柔性容器中之后,可密封开口边。在使用期间,组织可通过传达与指示符相关的信息及控制靠近柔性容器的条件和/或柔性容器的位置自动执行一个或多个组织处理步骤来处理。另外,可基于与指示符相关的信息控制将材料添加至试剂盒中。可过滤经处理组织中的至少一些以使得产生经过滤流体。经过滤流体中的至少一些可提供至冷藏柔性容器以使经过滤流体中存在的所需材料稳定化。

[0094] 如本文所述的处理可包括搅拌、提取及酶消化柔性容器中组织样品的至少一部分。在一些情况下,组织的此处理可导致从组织样品提取所需材料。举例而言,可从组织样品提取肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)。

[0095] 用于本文所描述的方法中的柔性容器(例如袋)可包括可热密封材料。

[0096] 使用冷藏保存试剂盒,从组织材料进行组织处理及提取可引起所需材料的分离。尤其地,材料(例如肿瘤浸润淋巴细胞(TIL))可为所需材料。

[0097] 在一些情况下,本文所述的冷藏保存试剂盒和/或其组件可单次用于自动化和/或半自动化过程中以用于细胞或细胞聚集体的解聚、富集和/或稳定化。在一些实施例中,用于冷藏保存试剂盒中的袋(例如收集袋)可用于多个过程。举例而言,收集袋可在不同位置重复密封以产生用于处理组织样品(例如活检样品和/或固体组织)的单独区室。

[0098] 用于本文中所描述的发明的柔性容器,例如袋(包括收集袋及冷藏保存袋),可包括由预定材料制成的至少一部分,该预定材料例如热塑性、聚烯烃聚合物、乙烯醋酸乙烯酯(EVA)、混合物(blends)(诸如共聚物,例如乙酸乙烯酯及聚烯烃聚合物混合物(即OriGen Biomedical EVO膜))、包括EVA的材料和/或可密封塑料的共挤层。收集袋,例如本发明的组织收集袋可包括由预定材料制成的用于接收组织的袋,该预定材料例如乙烯醋酸乙烯酯(EVA)和/或包括EVA的材料。可针对特定特性选择供用于袋的材料。在一个实施例中,袋(包括收集袋)可实质上由乙酸乙烯酯及聚烯烃聚合物混合物制成。举例而言,可用以选择用于冷藏保存试剂盒组件(诸如收集袋和/或相关联的导管)的材料的感兴趣的特性可与热密封相关。

[0099] 可针对特定特性和/或一系列特性选择供用于袋的材料,例如密封性(例如热密封性)、透气性、柔性(例如低温柔性)、弹性(例如低温弹性)、耐化学性、光学透明度、生物相容性(例如细胞毒性)、溶血性活性、抗浸出性、具有低微粒。

[0100] 在一些实施例中,可针对用于形成袋的至少一个层的共挤材料的特定特性选择材料。层可经构筑以使得当构筑时,袋的内层是相对生物兼容的,即:袋的内表面上的材料为稳定的且不浸滤至袋的内容物中。

[0101] 举例而言,可用以选择用于试剂盒组件的材料(例如收集袋、冷藏保存袋和/或相关联导管)的材料的感兴趣的特性可与密封(例如热密封)相关。

[0102] 袋(诸如收集袋和/或冷藏保存袋)及任何相关联导管可为大体上澄清、透明、半透明、任何所要颜色或其组合。组织收集袋和/或导管通常可通过类似于封闭和/或密封血液

和/或冷藏保存袋及相关联导管的制造的方式制造。本发明中的导管可由任何所需材料构筑,包括但不限于聚氯乙烯(PVC)。举例而言,PVC可为所需材料,因为PVC有利于熔接和/或密封。

[0103] 在一些实施例中,收集袋的至少一个末端可开口以供接收组织。尤其地,在一个实施例中,例如来自活检的组织样品可经由开口端(例如顶部末端)置于袋中。在一些情况下,活检样品可为来自动物(例如家畜,如狗或猫)或人类的癌组织。

[0104] 在组织定位于袋中之后,袋可经密封,且随后可经处理。处理可包括对袋中的组织进行搅拌(例如平缓搅拌)、提取和/或酶消化。可在封闭系统中进行组织处理及提取所需材料(例如肿瘤浸润淋巴细胞(TIL))。有利或优选实施例可包括用于鉴别收集组织所来自的患者的指示符和/或展示在仪器中收集袋可夹持、密封、受装置作用和/或贴附就位的位置的标记。

[0105] 在一些实施例中,袋可由可密封材料形成。举例而言,袋可由包括但不限于聚合物的材料形成,所述聚合物例如合成聚合物,包括脂族或半芳族聚酰胺(例如,尼龙)、乙烯-乙酸乙烯酯(EVA)及其混合物、热塑性聚氨酯(TPU)、聚乙烯(PE)、乙酸乙烯酯及聚烯烃聚合物混合物和/或聚合物组合。袋的一部分可使用能量,诸如热、射频能量、高频(HF)能量、介电质能量和/或本领域中已知的任何其它方法密封和/或熔接。

[0106] 收集袋可用作处理和/或解聚袋。收集袋可具有在约4cm至约12cm范围内的宽度及在约10cm至约30cm范围内的宽度。举例而言,用于处理的收集袋可具有约7.8cm的宽度及约20cm的长度。尤其地,袋可为可热密封的,例如使用EVA聚合物或其混合物、乙酸乙烯酯及聚烯烃聚合物混合物和/或一或多种聚酰胺(尼龙)。

[0107] 指示符可包括但不限于代码、字母、字组、名称、字母数字代码、数字、影像、条形码、快速响应(QR)码、标签、追踪器(诸如智能型追踪器标签或蓝牙追踪器)和/或本领域中已知的任何指示符。在一些实施例中,指示符可印刷于、蚀刻于和/或黏附于试剂盒的组件的表面上。指示符也可使用黏着剂定位于袋上,例如,贴纸或追踪器可置放于一个袋上和/或多个袋上。收集袋和/或冷藏保存试剂盒可包括多个指示符,诸如数字码和/或QR码。

[0108] 指示符(例如QR码、诸如智能型标签的标签和/或追踪器)可用于鉴别袋内的样品以及发指令给装置的处理器,以使得装置根据在冷藏保存试剂盒中进行的解聚、富集和/或稳定化过程类型运行特定程序。不同类型的培养基可用于这些过程中,例如酶培养基、肿瘤消化培养基和/或冷藏保存培养基,其可允许受控的冷冻速率。在一些实施例中,冷藏保存试剂盒和/或其组件可包括可由自动化装置读取的指示符。装置随后可执行用于在插入至此类装置时处理组织的特定全自动方法。本发明特别适用于样品处理,特别是自动化处理。在一些情况下,本文所述的冷藏保存试剂盒和/或其组件可单次用于自动化和/或半自动化过程中,以用于细胞或细胞聚集体的解聚、富集和/或稳定化。在一些实施例中,用于冷藏保存试剂盒中的袋(例如收集袋)可用于多个过程。举例而言,收集袋可在不同位置重复密封以产生用于处理组织样品(例如活检样品和/或固体组织)的单独区室。

[0109] 另外,标记可置放于袋(例如组织收集袋)上的各种位置处以指示袋可密封、夹持和/或贴附至对象的位置。在一些实施例中,可在使用之前将用于展示袋可夹持、密封和/或贴附至对象(诸如仪器)的位置的标记安置于袋上。举例而言,一个或多个标记可在制造期间定位于袋上。

[0110] 定位器可用于确保袋中的组织材料可在使用期间得到恰当的处理,例如位于仪器附近。在一些系统中,定位器可有助于本文中所描述的袋在自动化系统中的使用。尤其地,定位器可用于使袋移动穿过自动化系统。

[0111] 指示符(例如QR码)的使用可允许追踪特定样品的过程步骤,使得有可能在给定过程中跟踪样品。

[0112] 本发明涉及且提供治疗性细胞群体,如以下编号段落中所论述的:

[0113] 因此,本发明的一个目的为本发明内不涵盖任何先前已知的产物、制造该产物的过程,或使用该产物的方法,使得申请人保留权利且特此公开任何先前已知产物、工艺或方法的免责声明。另外应注意,本发明不意欲在本发明的范畴内涵盖不符合USPTO(35U.S.C.§ 112,第一段)或EPO(EPC的第83条)的书面描述及实现要求的任何产物、过程或该产物的制造或使用该产物的方法,使得申请人保留权利且特此公开任何先前所述产物、制造该产物的工艺或使用该产物的方法的免责声明。本发明的实践遵循EPC第53(c)条以及EPC规则28(b)及(c)可为有利的。明确地保留明确放弃作为本申请案的谱系中或任何其他谱系中或任何第三方的任何先前所申请的申请案中申请人的任何一个或多个所授予专利的主题的任何实施例的所有权利。本文中的任何内容不应被视作承诺。

[0114] 应注意,在本公开中,且尤其在权利要求和/或段落中,诸如“包含(comprises/comprised/comprising)”及其类似术语的术语可具有美国专利法中赋予其的含义;例如其可意指“包括(includes/included/including)”及其类似术语;此外,例如“基本上由……组成(consisting essentially of/consists essentially of)”的术语具有美国专利法中赋予其的含义,例如其允许不明确列举要素,但排除现有技术中所发现或影响本发明的基本或新颖特征的要素。

[0115] 这些及其它实施例公开于以下实施方式中或自以下实施方式中显而易见且由以下实施方式涵盖。

附图说明

[0116] 本专利或申请文件含有至少一张彩制图。在申请且支付必要费用后,专利局将提供具有一张或多张彩色图的本专利或专利申请公开的复本。

[0117] 以下详细描述以示例的方式给出,但不旨在将本发明仅限制于所描述的特定实施例,可以结合附图得到最佳理解。

[0118] 图1为用于解聚及消化固体组织材料的柔性容器的示意图。

[0119] 图2a为将消化的固体组织材料引导至后续模块或废料容器的一系列过滤模块的示意图。

[0120] 图2b为用于在废料的消化及移除之后富集细胞的柔性容器的示意图。

[0121] 图2c为用于在废料的消化及移除之后富集细胞的柔性容器的另一个实施例的示意图。

[0122] 图3a为在解聚固体组织材料和/或富集细胞之后用于稳定化细胞的柔性容器的示意图。

[0123] 图3b为柔性容器的另一个实施例的示意图,该柔性容器包含与其它柔性容器的连接,用于在解聚固体组织材料和/或富集细胞之后通过冷藏保存稳定化细胞。

[0124] 图4为无菌试剂盒的示意图。

[0125] 图5为条形图,其表明在从几秒至若干小时范围内的各种解聚时间的解聚过程中获得的细胞群中观测到的倍数变化。

[0126] 图6为描述使用用于不同起始溶液的多个柔性容器的半自动无菌组织处理方法的图,所述柔性容器是用于分解和稳定化的过程的模块的一部分。

[0127] 图7为描述含有在该过程中使用的培养基的柔性容器如何在无菌处理试剂盒和方法的模块之间共享的图。

[0128] 图8描绘用于产生TIL的方法的一般概述。

[0129] 图9描绘肿瘤起始材料的收集及处理的概述。

[0130] 图10描绘TIL制造过程的概述。

[0131] 图11A示出了用于处理及储存组织材料的试剂盒的实施例的视图。

[0132] 图11B示出了用于处理及储存组织材料的试剂盒的实施例的视图。

[0133] 图11C示出了用于处理及储存组织材料的试剂盒的实施例的视图。

[0134] 图11D示出了用于处理及储存组织材料的试剂盒的实施例的视图。

[0135] 图12A示出了收集袋的实施例的透视图。

[0136] 图12B示出了收集袋的实施例的透视图。

[0137] 图12C示出了收集袋的实施例的透视图。

[0138] 图12D示出了收集袋的实施例的透视图。

[0139] 图12E示出了收集袋的实施例的透视图。

[0140] 图13A示出了收集袋的实施例的正视图。

[0141] 图13B示出了收集袋的实施例的正视图。

[0142] 图13C示出了收集袋的实施例的正视图。

[0143] 图13D示出了收集袋的实施例的正视图。

[0144] 图13E示出了收集袋的实施例的正视图。

[0145] 图14示出了收集袋的实施例的后视图。

[0146] 图15示出了收集袋的实施例的侧视图。

[0147] 图16A示出了收集袋的实施例的俯视图。

[0148] 图16B示出了收集袋的实施例的底视图。

[0149] 图17A示出了用于密封其中的组织,以供用于本发明的处理的部分开放组织收集袋的实施例的俯视图,其中袋具有密封边缘。

[0150] 图17B示出了用于密封其中的组织,以供用于本发明的处理的开放组织收集袋的实施例的底视图,其中袋具有密封边缘。

[0151] 图18A示出了用于密封其中的组织,以供用于本发明的处理的部分开放组织收集袋的实施例的俯视图。

[0152] 图18B示出了用于密封其中的组织,以供用于本发明的处理的完全开放组织收集袋的实施例的俯视图。

[0153] 图19A示出了用于密封其中的组织,以供用于本发明的处理的部分开放组织收集袋的实施例的俯视图,其中袋具有预定宽度的密封边缘。

[0154] 图19B示出了用于密封其中组织,以供用于本发明的处理的完全开放组织收集袋

的实施例的俯视图,其中袋具有预定宽度的密封边缘。

[0155] 图20A示出了收集袋的实施例的正视图。

[0156] 图20B示出了收集袋的实施例的正视图。

[0157] 图20C示出了收集袋的实施例的正视图。

[0158] 图20D示出了收集袋的实施例的正视图。

[0159] 图20E示出了收集袋的实施例的正视图。

[0160] 图21A示出了收集袋的实施例的正视图。

[0161] 图21B示出了收集袋的实施例的正视图。

[0162] 图21C示出了收集袋的实施例的正视图。

[0163] 图21D示出了收集袋的实施例的正视图。

[0164] 图21E示出了收集袋的实施例的正视图。

[0165] 图22A示出了收集袋的实施例的正视图。

[0166] 图22B示出了收集袋的实施例的正视图。

[0167] 图22C示出了收集袋的实施例的正视图。

[0168] 图22D示出了收集袋的实施例的正视图。

[0169] 图23示出了收集袋的实施例的正视图。

[0170] 图24示出了收集袋的实施例的正视图。

[0171] 图25示出了收集袋的实施例的正视图。

[0172] 图26示出了耦接于导管及端口的收集袋的实施例的正视图。

[0173] 图27A示出了使用前的收集袋的实施例的正视图。

[0174] 图27B示出了例如在材料沉积于袋内之后已经密封的收集袋的实施例的正视图。

[0175] 图28示出了包括开放收集袋及冷藏保存袋的、面朝上的冷藏保存试剂盒的实施例的俯视图。

[0176] 图29示出了面朝下的冷藏保存试剂盒的实施例的俯视图,该冷藏保存试剂盒包含收集袋和冷藏保存袋,该收集袋指示其应在何处封闭。

[0177] 图30示出了面朝上的冷藏保存试剂盒的实施例的俯视图,该冷藏保存试剂盒包含封闭收集袋和冷藏保存袋。

[0178] 图31示出了面朝上的冷藏保存试剂盒的实施例的侧视图,该冷藏保存试剂盒包含封闭收集袋和冷藏保存袋。

[0179] 图32示出了冷藏保存试剂盒的实施例的端视图。

[0180] 图33示出了收集袋的实施例的俯视图,该收集袋包括耦接于导管的标志。

[0181] 图34示出了冷藏保存试剂盒的实施例的正视图,该冷藏保存试剂盒包括收集袋、过滤器及冷藏保存袋。

[0182] 图35示出了冷藏保存试剂盒的实施例的正视图,该冷藏保存试剂盒包括收集袋、过滤器及冷藏保存袋。

[0183] 图36A示出了冷藏保存试剂盒的实施例的正视图,该冷藏保存试剂盒包括收集袋、过滤器及冷藏保存袋。

[0184] 图36B示出了收集袋的实施例的侧视图;在使用期间,使用接近该收集袋的表面的夹具、铰链及闩锁以及杆对该收集袋进行紧固。

- [0185] 图36C示出了位于收集袋上的夹具的分解视图。
- [0186] 图37示出了冷藏保存试剂盒的实施例的正视图,该冷藏保存试剂盒包括收集袋、过滤器及冷藏保存袋。
- [0187] 图38示出了冷藏保存试剂盒的实施例的正视图,该冷藏保存试剂盒包括收集袋、过滤器及冷藏保存袋。
- [0188] 图39示出了通过夹具紧固的收集袋的实施例的正视图。
- [0189] 图40示出了收集袋的实施例的正视图。
- [0190] 图41示出了用于在封闭样品容器内将组织解聚成单个细胞或细胞团块的踩踏装置(treading device)的正视图。
- [0191] 图42及图43示出了处于两个不同的操作位置的图41的装置;图44示出了前述图中所示出的装置的平面视图。
- [0192] 图45示出了装置的替代性构造的另一平面视图。
- [0193] 图46、47及48示出了适合与图41至45的装置一起使用的样品容器的三个不同构造。
- [0194] 图49示出了制备供使用的样品袋。
- [0195] 图51A、51B及51C示出了对样品袋进行密封的替代性方式。
- [0196] 图52、53及54示出了用于制备使用的袋的设备及技术。
- [0197] 图55示出了将样品袋或容器装载至踩踏装置中。
- [0198] 图56、57及58示出了用于分开解聚样品的设备。
- [0199] 图59、60及61示出了用于控制样品或经分开的样品的温度的设备。
- [0200] 图62至64示出了踩踏装置的另一个实施例。
- [0201] 图65为用于收集、处理及冷藏保存肿瘤组织的示例性流程图。
- [0202] 图66为从经处理及冷藏保存的肿瘤组织制造TIL的示例性流程图。
- [0203] 图67比较了冷藏保存和新鲜的解聚细胞悬浮液的产量(图67A)、存活百分比(图67B)及CD3+T细胞百分比(图67C)。
- [0204] 图68A及68B比较了经市售冷藏保存剂冷藏保存的PBMC的存活率。
- [0205] 图69比较了经消化,随后冷藏保存的PBMC的存活率,该冷藏的方案为:将材料维持在4℃下10分钟,随后以-1℃/min的速率降低温度或直接以-2℃/min的速率自35℃降低至-80℃。
- [0206] 图70比较了从样品袋记录的温度,该样品袋遵循以下方案:将材料维持在4℃下10分钟,随后以-1℃/min的速率降低温度或直接以-2℃/min的速率自35℃降低至-80℃。
- [0207] 图71描绘了TIL077的解聚及冷藏保存:(A)解聚器速度设定点;(B)解聚器速度纪录;(C)温度设定点(解聚);(D)低温盘(cryo-plate)温度纪录(解聚);(E)温度设定点(冷藏保存);(F)温度纪录(冷藏保存);(G)设定点冷却速率;(H)低温盘冷却速率纪录。
- [0208] 图72描绘了TIL078的Tiss-U-Stor解聚及冷藏保存(2个袋中的1个):(A)解聚器速度设定点;(B)解聚器速度纪录;(C)温度设定点(解聚);(D)低温盘温度纪录(解聚);(E)温度设定点(冷藏保存);(F)温度纪录(冷藏保存);(G)设定点冷却速率;(H)低温盘冷却速率纪录。
- [0209] 图73描绘了连续过程中的TIL078的Tiss-U-Stor解聚及冷藏保存:(A)解聚器速度

设定点；(B) 解聚器速度纪录；(C) 温度设定点 (解聚及冷藏保存)；(D) 低温盘温度纪录 (解聚及冷藏保存)；(E) 冷却速率设定点 (解聚及 (冷藏保存)；(F) 低温盘冷却速率纪录 (解聚及 (冷藏保存)。

[0210] 图74描绘了示出了最佳总体反应及肿瘤负荷变化百分比的瀑布图。CR, 完全反应；PD, 进行性疾病；PR, 部分反应；SD, 稳定疾病。肿瘤负荷定义为目标病变的直径总和；肿瘤负荷的变化定义为从基线至基线后最低点的变化。在两个CR患者中均使用最小基线后SLD为0, 这些患者在评估CR的问诊时并未报导目标病变量测值 (未通过CT/MRI扫描观测到疾病或转移)。具有PD的最佳总体反应的一个对象并未报导任何治疗后目标病变量测值 (通过观测新病变测定的进展) 且因此未在图中呈现。

[0211] 图75描绘总存活时间。(A) 所有21名治疗患者的中位数总存活 (OS) 时间为21.3个月。(B) 具有定量反应数据的15名患者的中位数OS时间为16个月。(C) 无反应者 (N=7) 的中位数OS时间为6.5个月。未得到反应者 (仅根据定量反应, N=8) 的中位数OS时间。

[0212] 图76描绘所制造的TIL的特征。(A) 在全规模ITIL-168GMP运作的TIL过度生长阶段 (阶段1) 期间的细胞计数。(B) 在全规模ITIL-168GMP运作的TIL REP阶段 (阶段2) 期间的细胞计数。(C) 在全规模ITIL-168GMP运作期间的存活百分比 (活CD3+细胞%)。

具体实施方式

[0213] 除非另有定义, 否则本文使用的所有技术和科学术语具有与本发明所属领域的技术人员通常理解的含义。

[0214] 术语“抗CD3抗体”指抗体或其变异体, 例如单克隆抗体且包括人类、人类化、嵌合、鼠类或哺乳动物抗体, 其针对成熟人类T细胞的T细胞抗原受体中的CD3受体。抗CD3抗体包括OKT-3, 亦称为莫罗莫那 (muromonab)。抗CD3抗体亦包括UHCT1克隆, 亦称为T3及CD3.ε。其它抗CD3抗体包括例如奥昔珠单抗 (otelixizumab)、特普珠单抗 (teplizumab) 及维西珠单抗 (visilizumab)。

[0215] 当指示“抗肿瘤有效量”、“肿瘤抑制有效量”或“治疗量”时, 本发明组合物待施用的确切量可由医师考虑患者 (对象) 的年龄、体重、肿瘤大小、感染或转移程度及病状的个体差异来确定。一般可规定包含本文所描述的肿瘤浸润淋巴细胞 (例如二级TIL或经遗传修饰的细胞毒性淋巴细胞) 的医药组合物可以以下剂量施用: 10^4 至 10^{11} 个细胞/公斤体重 (例如 10^5 至 10^6 、 10^5 至 10^{10} 、 10^5 至 10^{11} 、 10^6 至 10^{10} 、 10^6 至 10^{11} 、 10^7 至 10^{11} 、 10^7 至 10^{10} 、 10^8 至 10^{11} 、 10^8 至 10^{10} 、 10^9 至 10^{11} 或 10^9 至 10^{10} 个细胞/公斤体重), 包括这些范围内的所有整数值。肿瘤浸润淋巴细胞 (在一些情况下包括经遗传修饰的细胞毒性淋巴细胞) 组合物也可以这些剂量多次施用。肿瘤浸润淋巴细胞 (在一些情况下包括遗传) 可通过使用免疫疗法中公知的输液技术施用 (参见例如Rosenberg等人, New Eng. J. of Med. 319:1676, 1988)。医学领域的技术人员可以通过监测患者的病症并相应地调整治疗来容易地确定特定患者的最佳剂量和治疗方案。

[0216] 本文所用的术语“共施用 (co-administration)”、“共施用 (co-administering)”、“组合施用 (administered in combination with)”、“组合施用 (administering in combination with)”、“同时”及“并行”涵盖向对象施用两种或更多种活性医药成分 (在本发明的一个优选实施例中, 例如至少一种钾通道激动剂与复数个TIL的组合), 使得两种活

性医药成分和/或其代谢物同时存在于对象中。共施用包括以分开的组合物同时施用、以分开的组合物在不同时间施用或以其中存在两种或更多种活性医药成分的组合物的形式施用。优选以分开的组合物同时施用及以其中存在两种试剂的组合物的形式施用。

[0217] 本文所使用的“细胞化 (cellularized/cellularization)”指解聚的过程,其使固体组织,通常由多种细胞谱系/类型构成的多细胞材料,分解为少量细胞,包括但不限于一个细胞,但可为极少量的各种谱系或细胞类型的多个细胞,即细胞团块或细胞聚集体。

[0218] 本文所使用的“封闭系统”指对外部环境封闭的系统。适用于细胞培养方法的任何封闭系统可与本发明的方法一起使用。封闭系统包括例如但不限于封闭G-Rex容器或细胞培养袋。一旦将肿瘤区段添加至封闭系统中,该系统就不对外部环境开放,直至TIL准备好施用于患者。在一个有利的实施例中,封闭系统为PCT公开号WO 2018/130845中所公开的系统。

[0219] 本文所使用的“冷藏保存培养基 (cryopreservation media)”或“冷藏保存培养基 (cryopreservation medium)”指可用于冷藏保存细胞的任何培养基。此类培养基可包括包含2%至10%的DMSO的培养基。示例性的培养基包括CryoStor CS10、HypoThermosol、Bloodstor BS-55以及其组合。

[0220] 本文中的术语“冷藏保存的TIL”意指初级、本体 (bulk) 或经扩增的TIL (REP TIL) 经处理且储存在约-190℃至-60℃的范围内。冷藏保存的通用方法亦描述于本文别处,包括实施例中。为了清楚起见,“冷藏保存的TIL”可与可用作初级TIL来源的冷冻组织样品区分。

[0221] 本文所使用的“耗乏” (depletion) 是指将所需要的细胞与不需要的细胞分离的负向选择的过程,这些不需要的细胞被与固相耦合的标记结合片段所标记。

[0222] 本文所使用的“解聚 (disaggregation/disaggregate)”指将固体组织转化成单个细胞或小细胞数目聚集体,其中作为球状体的单个细胞的直径在5μm、6μm、7μm、8μm、9μm、10μm、20μm、30μm、40μm、50μm、60μm、70μm、80μm、90μm、100μm或更大的范围内,其中此更常在7至20μm之间。

[0223] 术语“有效量”或“治疗有效量”指如本文所述的化合物或化合物组合的足以实现预期应用 (包括但不限于疾病治疗) 的量。治疗有效量可视预期应用 (体外或体内) 或所治疗的对象及疾病病状 (例如对象的体重、年龄及性别)、疾病病状的严重程度或施用方式而变化。该术语亦适用于将诱发目标细胞中的特定反应 (例如血小板黏附和/或细胞迁移减少) 的剂量。特定剂量将视以下而变化:所选的特定化合物、所遵循的给药方案、化合物是否与其他化合物组合施用、施用时间、其所施用的组织及其中携带该化合物的物理递送系统。

[0224] 本文所使用的“工程化”指添加核酸材料或因子,其将组织来源的细胞功能自其原始功能改变为具有新的或改良的功能,以用于其最终用途。

[0225] 本文所使用的“酶培养基”指具有酶活性,例如胶原蛋白酶、胰蛋白酶、脂肪酶、玻尿酸酶、脱氧核糖核酸酶、Liberase HI、胃蛋白酶或其混合物的培养基。

[0226] 如本文所使用的“滤液”指通过过滤器、网或膜的材料。

[0227] 本文所用的“柔性容器”指具有一种或多种不同类型的膜的、呈多种形式的柔性包装系统。选择各膜类型,以提供特定特征以保存无菌流体、固体组织来源的细胞材料的物理、化学及功能特征及容器完整性,视过程步骤而定。

[0228] 在本领域中还被称为冷藏保存剂的“冷冻溶液”或“冷藏保存溶液”为含有冷藏保

护添加剂的溶液。这些一般为渗透性的无毒化合物,其改变细胞在冷冻期间承受的物理应力以最小化冷冻损伤(即由于冰的形成)且最常为某%vol/vol的以下中的一个或多个:二甲亚砜(DMSO);乙二醇;丙三醇;2-甲基-2,4-戊二醇(MPD);丙二醇;蔗糖;及海藻糖。

[0229] 术语“恶性血液病”指造血及淋巴组织(包括但不限于血液、骨髓、淋巴结及淋巴系统的组织)的哺乳动物癌症及肿瘤。恶性血液病也被称为“液体肿瘤”。恶性血液病包括但不限于急性淋巴母细胞白血病(ALL)、慢性淋巴细胞性淋巴瘤(CLL)、小淋巴细胞性淋巴瘤(SLL)、急性骨髓性白血病(AML)、慢性骨髓性白血病(CML)、急性单核细胞性白血病(AMoL)、霍奇金氏淋巴瘤(Hodgkin's lymphoma)及非霍奇金氏淋巴瘤。术语“恶性B细胞血液病”指的是影响B细胞的恶性血液病。

[0230] 术语“IL-2”(在本文中亦称为“IL2”)指被称为白介素-2的T细胞生长因子,且包括IL-2的所有形式,包括人类及哺乳动物形式、保守氨基酸取代、糖型、生物类似物及其变体。IL-2在例如Nelson, J. Immunol. 2004, 172, 3983-88及Malek, Annu. Rev. Immunol. 2008, 26, 453-79中描述,其公开的内容以引用的方式并入本文中。在表2中给出适用于本发明的重组人类IL-2的氨基酸序列(SEQ ID NO:3)。举例而言,术语IL-2涵盖IL-2的人类重组形式,例如阿地白介素(aldesleukin) (PROLEUKIN, 可从多个供应商处以每单次使用瓶2200IU购买),以及由CellGenix公司, Portsmouth, N.H., USA (CELLGRO GMP) 或ProSpec-Tany TechnoGene有限公司, East Brunswick, N.J., USA (目录号CYT-209-b) 商业供应的重组IL-2形式,及来自其他供货商的其它商业等效物。阿地白介素(des-alanyl-1, 丝氨酸-125人类IL-2) 为分子量大约为15kDa的IL-2的非糖基化人类重组形式。术语IL-2还涵盖如本文所述的IL-2的聚乙二醇化形式,包括可购自Nektar Therapeutics, South San Francisco, Calif., USA的聚乙二醇化IL2前药NKTR-214。适用于本发明的NKTR-214及聚乙二醇化IL-2描述于美国专利申请公开US 2014/0328791 A1及国际专利申请公开W0 2012/065086 A1中。适用于本发明的结合IL-2的替代形式描述于美国专利第4,766,106号、第5,206,344号、第5,089,261号及第4902,502号中。适用于本发明的IL-2制剂描述于美国专利第6,706,289号中。

[0231] 术语“IL-4”(在本文中亦称为“IL4”)指被称为白介素4的细胞因子,其由Th2 T细胞及嗜酸性球、嗜碱性球及肥大细胞产生。IL-4调节初始辅助T细胞(Th0细胞)分化成Th2 T细胞。Steinke及Borish, Respir. Res. 2001, 2, 66-70。在由IL-4活化后, Th2 T细胞随后在正反馈回路中产生额外IL-4。IL-4还刺激B细胞增殖及II类MHC表达,且诱导从B细胞的到IgE及IgG1表达的类别转换。适用于本发明的重组人类IL-4可购自多个供货商,包括ProSpec-Tany TechnoGene有限公司, East Brunswick, N.J., USA (目录号CYT-211) 及ThermoFisher Scientific公司, Waltham, Mass., USA (人类IL-15重组蛋白, 目录号Gibco CTP0043)。

[0232] 术语“IL-7”(在本文中亦称为“IL7”)指被称为白介素7的糖基化组织来源的细胞因子,其可获自基质及上皮细胞以及树突状细胞。Fry及Mackall, Blood 2002, 99, 3892-904 IL-7可刺激T细胞的产生。IL-7结合至IL-7受体, IL-7受体为由IL-7受体 α 及共同 γ 链受体组成的异二聚体,其属于对于T细胞在胸腺内的产生及周边内的存活而言重要的一系列信号。适用于本发明的重组人类IL-7可购自多个供货商,包括ProSpec-Tany TechnoGene有限公司, East Brunswick, N.J., USA (目录号CYT-254) 及ThermoFisher Scientific公司, Waltham, Mass., USA (人类IL-15重组蛋白, 目录号Gibco PHC0071)。

[0233] 术语“IL-12”（在本文中亦称为“IL12”）指被称为白介素-12的T细胞生长因子。白介素（IL）-12为一种分泌性异二聚细胞因子，其包含2个二硫键连接的糖基化蛋白质亚基，其因为它们近似分子量而被命名为p35及p40。IL-12主要由抗原呈递细胞产生，并通过与表达于T细胞或自然杀手（NK）细胞表面上的双链受体复合物结合来驱动细胞介导的免疫性。IL-12受体 β -1（IL-12R β 1）链结合于IL-12的p40亚基，提供IL-12与其受体之间的主要相互作用。然而，正是第二受体链IL-12R β 2的IL-12p35接合赋予细胞内信号传导。与抗原呈递同时发生的IL-12信号传导被认为针对T辅助1（Th1）表型引起T细胞分化，其特征为干扰素 γ （IFN γ ）的产生。据信，Th1细胞促进针对一些细胞内病原体的免疫性，产生补体固定（complement-fixing）抗体同型，且有助于肿瘤免疫监视。因此，认为IL-12为宿主防御免疫机制的显著组分。IL-12为细胞因子的IL-12家族的一部分，其也包括IL-23、IL-27、IL-35、IL-39。

[0234] 术语“IL-15”（在本文中亦称为“IL15”）指被称为白介素-15的T细胞生长因子，并包括IL-15的所有形式，包括人类及哺乳动物形式、保守氨基酸取代、糖型、生物类似物及其变异体。IL-15描述于例如Fehniger及Caligiuri, Blood 2001, 97, 14-32中，其公开内容以引用的方式并入本文中。IL-15与IL-2共有 β 及 γ 信号传导受体亚基。重组人类IL-15为含有114个氨基酸（及N端甲硫氨酸）及12.8kDa的分子量的单一非糖基化多肽链。重组人类IL-15可购自多个供货商，包括ProSpec-Tany TechnoGene有限公司, East Brunswick, N.J., USA（目录号CYT-230-b）及ThermoFisher Scientific公司, Waltham, Mass., USA（人类IL-15重组蛋白，目录号34-8159-82）。

[0235] 术语“IL-18”（在本文中亦称为“IL18”）指被称为白介素-18的T细胞生长因子。白介素-18（IL-18）为由于其结构、受体家族及信号转导路径而属于IL-1细胞因子家族的促炎性细胞因子。相关的细胞因子包括IL-36、IL-37、IL-38。

[0236] 术语“IL-21”（在本文中也称为“IL21”）指被称为白介素-21的多效性细胞因子蛋白质，且包括IL-21的所有形式，包括人类及哺乳动物形式、保守氨基酸取代、糖型、生物类似物及其变异体。IL-21描述于例如Spolski及Leonard, Nat. Rev. Drug. Disc. 2014, 13, 379-95中，其公开内容以引用的方式并入本文中。IL-21主要由自然杀手T细胞及活化的人类CD4⁺T细胞产生。重组人类IL-21为含有132个氨基酸、具有15.4kDa的分子量的单一非糖基化多肽链。重组人类IL-21可购自多个供货商，包括ProSpec-Tany TechnoGene有限公司, East Brunswick, N.J., USA（目录号CYT-408-b）及ThermoFisher Scientific公司, Waltham, Mass., USA（人类IL-21重组蛋白，目录号14-8219-80）。

[0237] 术语“液体肿瘤”指性质上为流体的异常细胞团。液体肿瘤癌症包括但不限于白血病、骨髓瘤及淋巴瘤，以及其他恶性血液病。获自液体肿瘤的TIL在本文中亦可被称为骨髓浸润淋巴细胞（MIL）。

[0238] 如本文所用，“磁性粒子”中的“磁性”是指磁性粒子的所有亚型，其可以用本领域技术人员熟知的方法制备，尤其铁磁性粒子、超顺磁粒子及顺磁性粒子。“铁磁性”材料具有强磁场磁化率且能够在磁场移除时保持磁特性。“顺磁性”材料仅具有弱磁化率，且当移除磁场时快速失去其弱磁性。“超顺磁”材料具有高磁化率，亦即当置放于磁场中时，其变为强磁性，但像顺磁性材料，快速失去其磁性。

[0239] 本文所述“标记物”指的是细胞抗原，其由某一细胞类型特异性表达。优选地，标记

物为细胞表面标记物,使得可进行活细胞的富集、分离和/或检测。

[0240] 本文所使用的“标记物结合片段”指优先结合于细胞的所希望的目标分子(即抗原)的任何部分。术语“部分(moiety)”包含例如抗体或抗体片段。本文所使用的术语“抗体”指的是多克隆或单克隆抗体,其可以用本领域技术人员熟知的方法制备。抗体可为任何物种,例如鼠类、大鼠、绵羊、人类。出于治疗目的,若将使用非人类抗原结合片段,则这些片段可通过此项技术中已知的任何方法人类化。抗体亦可为经修饰的抗体(例如寡聚物、经还原、经氧化及经标记的抗体)。术语“抗体”包含完整分子及抗体片段,诸如Fab、Fab’、F(ab’)2、Fv及单链抗体。另外,术语“标记物结合片段”包括除优先结合于细胞的所希望的目标分子的抗体或抗体片段以外的任何部分。适合的部分包括但不限于结合至所希望的目标分子的、被称为适体的寡核苷酸(Hermann及Pantel,2000:Science 289:820-825)、碳水化合物、凝集素或任何其他抗原结合蛋白(例如受体-配体相互作用)。

[0241] “培养基”意指是指细胞培养、细胞处理和稳定化领域中已知的用于减少细胞死亡的各种溶液,包括但不限于以下培养基中的一个或多个:器官保存溶液、选择性溶解溶液、PBS、DMEM、HBSS、DPBS、RPMI、伊格尔培养基(Iscove’s medium)、X-VIVO™、乳酸林格氏溶液(Lactated Ringer’s solution)、林格氏乙酸溶液(Ringer’s acetate)、生理盐水、PLASMALYTE™溶液、胶体溶液及IV流体、胶体溶液及IV流体、5%右旋糖水溶液(D5W)、哈特曼氏液(Hartmann’s Solution)。培养基可为标准细胞培养基,如以上提及的培养基,或用于例如原代人类细胞培养(例如用于内皮细胞、肝细胞或角质细胞)或干细胞(例如树突状细胞成熟、造血扩增、角质细胞、间充质干细胞或T细胞扩增)的特殊培养基。培养基可具有本领域公知的补充剂或试剂,例如白蛋白及转运蛋白、氨基酸及维生素、抗生素、连接因子(attachments factor)、生长因子及细胞因子、激素、代谢抑制剂或增溶剂。各种培养基可商购自例如ThermoFisher Scientific或Sigma-Aldrich。

[0242] 本文所使用的术语“微环境”可指整体上的固体或血液肿瘤微环境或指微环境内的细胞的个别子集。本文所使用的“肿瘤微环境”指以下的复杂混合物:“细胞、可溶因子、信号传导分子、细胞外基质及促进恶性转化(neoplastic transformation)、支持肿瘤生长及侵袭、保护肿瘤避免宿主免疫性、促进治疗抵抗力,及为主要转移瘤的生长提供生态位(niche)的机械信号”,如Swartz等人,Cancer Res.,2012,72,2473中所述。尽管肿瘤表达应由T细胞识别的抗原,但由于微环境的免疫抑制,由免疫系统清除肿瘤为罕见的。

[0243] 本文所使用的术语“负分离”指由耦合至固相的一种标记物结合片段结合的细胞的主动分离,且这些细胞不为所希望的细胞群体。

[0244] 本文所使用的“未标记”或“未改变”指未由耦合至固相的一种标记物结合片段结合的细胞。未标记、未改变的细胞部分含有所希望的目标细胞。

[0245] 本文所使用的“非目标细胞”指由用于移除不需要的细胞类型的、耦合至固相的一种标记物结合片段特异性结合的细胞。

[0246] “OKT-3”(在本文中亦称为“OKT3”)指针对成熟T细胞的T细胞抗原受体中的CD3受体的单克隆抗体或其生物类似物或变异体,包括人类、人类化、嵌合或鼠类抗体,且包括市售形式,例如OKT-3(30ng/mL,MACS GMP CD3纯,Miltenyi Biotech公司,San Diego, Calif.,USA)及莫罗莫那或其变异体、保守氨基酸取代、糖型或生物类似物。

[0247] 本文所使用的“粒子”是指固相,诸如胶态粒子、微球体、纳米粒子或珠粒。产生此

类粒子的方法在本技术领域中公知的。粒子可为磁性粒子或具有其他选择性特性。粒子可在溶液或悬浮液中,或其可在用于本发明之前呈冻干状态。冻干粒子随后在与关于本发明的待处理的样品接触之前在适宜的缓冲剂中复原。

[0248] 术语“外周血单个核细胞”及“PBMC”指具有圆形细胞核的外周血细胞,包括淋巴细胞(T细胞、B细胞、NK细胞)及单核细胞。优选地,外周血单个核细胞为经照射的同种异体外周血单个核细胞。PBMC为一种类型的抗原呈递细胞。

[0249] 术语“药学上可接受的载体”或“药学上可接受的赋形剂”旨在包括任何及所有溶剂、分散介质、包衣、抗细菌及抗真菌剂、等渗剂及吸收延迟剂及惰性成分。此类药学上可接受的载体或药学上可接受的赋形剂用于活性医药成分的用途为本领域所公知的。除非任何常规的药学上可接受的载体或药学上可接受的赋形剂与活性药物成分不相容,否则考虑其在本发明的治疗组合物中的用途。额外的活性医药成分(例如其它药物)也可并入所描述的组合物及方法中。

[0250] 本文的术语“细胞群体”(包括TIL)意指享有共同特征的多个细胞。一般而言,群体一般数目在 1×10^6 至 1×10^{12} 的范围内,其中不同的TIL群体包含不同数目。

[0251] 本文所使用的“正分离”是指由耦合至固相的一种标记物结合片段结合的细胞的主动分离,且这些细胞为所需的细胞群体。

[0252] 本文所使用的“负分离”是指由耦合至固相的一种标记物结合片段结合的细胞的主动分离,且这些细胞不是所需的细胞群体。

[0253] 本文所使用的“纯度”是指自原始固体组织所希望的一个或多个目标群体的百分比。

[0254] “快速扩增”意谓抗原特异性TIL的数目在一周的时间段内增加至少约3倍(或4倍、5倍、6倍、7倍、8倍或9倍),优选为在一周的时间段内至少约10倍(或20倍、30倍、40倍、50倍、60倍、70倍、800倍或90倍),更优选为在一周的时间段内至少约100倍(或200倍、300倍、400倍、500倍、600倍、700倍、800倍或900倍),或最优选为在一周的时间段内至少约1000倍或2000倍、3000倍、4000倍、5000倍、6000倍、7000倍、8000倍或9000倍)。多个快速扩增方案概述于下文。

[0255] “再生药品”、“过继细胞疗法”或“晚期(advanced)疗法医药产品”在本文中可互换地使用,指通过以下的任一用于一种或多种哺乳动物的治疗目的的细胞材料:一部分或所有细胞材料的作用;一部分或所有细胞材料的支持性作用,其旨在施用后改善哺乳动物的健康。治疗性细胞可直接使用或可需要进一步处理、扩增和/或工程化以提供这些作用。

[0256] 本文所使用的“样品”是指含有任何比率的细胞的样品。优选地,这些细胞为活细胞。在一些情况下,这些细胞亦可为可用于后续核酸或蛋白质提取的固定或冷冻细胞。样品可来自动物,尤其哺乳动物,诸如小鼠、大鼠或人类。可使用含有细胞的任何可压缩固体组织。本发明主要通过从实体肿瘤组织分离造血及癌细胞来说明。然而,本发明涉及一种用于从任何哺乳动物固体组织分离一系列细胞的方法。

[0257] 本文所使用的“固相”是指结合于另一底物(例如粒子、荧光团、半抗原例如生物素、聚合物或较大的表面,例如培养皿及微量滴定盘)的标记物结合片段(例如抗体)的耦合。在一些情况下,耦合使得抗原结合片段直接固定,例如若抗原结合片段耦合至培养皿的较大表面。在其它情况下,此耦合引起间接固定,例如如果将磁珠保持在磁场中,则直接或

间接(通过例如生物素)与所述磁珠耦合的抗原结合片段得到固定。在其他情况下,抗原结合片段与其它分子的耦合不引起直接或间接固定,而允许根据本发明的细胞的富集、分开、分离及检测,例如,如果标记物结合片段耦合至化学或物理部分,其随后允许例如通过流式细胞术方法(如FACS分选)或荧光显微术鉴别经标记的细胞及未经标记的细胞。

[0258] 如本文所使用的“固体组织”是指一块或多块动物来源的哺乳动物固体组织,其三维(即作为几何主体的长度、宽度及厚度)大于基于多个单独细胞的单元的大小,且通常含有结缔材料,诸如胶原蛋白或构成组织结构的类似基质,藉此该固体组织不可流动通过管或通过注射器或类似的小管道或容器收集,且为,例如,具有500 μ m、1mm、2mm、3mm、4mm、5mm、1cm、2cm、3cm、4cm、5cm、10cm、20cm、30cm或更大范围内的尺寸。

[0259] “实体肿瘤”是指通常不包含囊肿或液体区域的异常组织块。实体肿瘤可为良性或恶性的。术语“实体肿瘤癌症”指恶性、赘生性或癌性实体肿瘤。实体肿瘤癌症包括但不限于肉瘤、癌瘤及淋巴瘤,诸如肺癌、乳腺癌、前列腺癌、结肠癌、直肠癌及膀胱癌。实体肿瘤的组织结构包括相互依赖的组织区室,包括实质(癌细胞)和支持基质细胞,所述支持基质细胞中的癌细胞分散且可提供支撑微环境。在一些实施例中,癌症选自宫颈癌、头颈癌(包括例如头颈部鳞状细胞癌[HNSCC])神经胶质母细胞瘤、卵巢癌、肉瘤、胰脏癌、膀胱癌、乳腺癌、三阴性乳腺癌及非小细胞肺癌。实体肿瘤的组织结构包括相互依赖的组织区室,包括实质(癌细胞)和支持基质细胞,所述支持基质细胞中的癌细胞分散且可提供支撑微环境。

[0260] 本文的“解冻冷藏保存的TIL”意指之前经冷藏保存且随后处理以恢复至室温或更高温度(包括但不限于细胞培养温度或可向患者施用TIL的温度)的TIL群体。

[0261] 术语“治疗(treatment)”、“治疗(treating)”、“治疗(treat)”及其类似术语指的是获得所希望的药理学和/或生理学效果。就完全或部分预防疾病或其症状而言,该效果可以是预防性的和/或就疾病的部分或完全治愈和/或归因于该疾病的副作用而言,该效果可以是治疗性的。本文所使用的“治疗”涵盖哺乳动物(尤其人类)的疾病的任何治疗,且包括:(a) 预防可能易患疾病但尚未诊断出患有该疾病的对象中出现该疾病;(b) 抑制疾病,即遏制其发展或进展;及(c) 缓解疾病,即促使疾病消退和/或缓解一种或多种疾病症状。“治疗”还意欲涵盖试剂的递送,以便提供药理学作用,即使在不存在疾病或病状的情况下也如此。举例而言,“治疗”包括在没有疾病状况的情况下递送可以引发免疫反应或赋予免疫性的组合物,例如在疫苗的情况下。

[0262] 本文中的“肿瘤浸润淋巴细胞”或“TIL”是指最初作为白细胞获得的细胞群体,其已经离开对象的血流并迁移到肿瘤中。TIL包括但不限于CD8⁺细胞毒性T细胞(淋巴细胞)、Th1及Th1⁷CD4⁺T细胞、自然杀手细胞、树突状细胞及M1巨噬细胞。TIL包括初级TIL及二级TIL。“初级TIL”为如本文所概述的、获自患者组织样品的那些TIL(有时被称为“新鲜收集”),而“二级TIL”为如本文所讨论的、经扩增或增殖的任何TIL细胞群体,包括但不限于本体TIL及扩增TIL(“REP TIL”或“REP后TIL”)。TIL细胞群体可包括经遗传修饰的TIL。TIL通常可以使用细胞表面标志物在生化上定义,也可以通过其浸润肿瘤和影响治疗的能力在功能上定义。TIL一般可通过表达以下生物标记中的一个或多个而分类:CD4、CD8、TCR $\alpha\beta$ 、CD27、CD28、CD56、CCR7、CD45Ra、CD62L、CD95、PD-1及CD25。另外及替代地,TIL可根据在再引入患者中时浸润实体肿瘤的能力以在功能上定义。TIL可进一步通过效能表征——例如,如果TILs响应于TCR接合而产生例如大于约50pg/mL、大于约100pg/mL、大于约150pg/mL或大

于约200pg/mL的干扰素 (IFN) 释放,则可以认为TILS是有效的或功能性的,或更优选地,通过流式细胞术,在TCR诱导的刺激后,单个细胞可通过CD137、CD107a、INF- γ TNF- α 及IL-2的细胞内染色以具有效能。

[0263] 本文所使用的“保留物”是指不通过过滤器、网或膜的材料。

[0264] 如文所使用的“最终用途”是指制造或直接用于再生药品、过继细胞疗法、ATMP、诊断性活体外研究或科学研究。

[0265] 本发明涉及肿瘤浸润淋巴细胞 (TIL),尤其是未经修饰的TIL (UTIL),其可分离自转移性癌症患者的肿瘤,包括从同一个癌症患者产生并返回至同一个癌症患者的自体TIL。本发明也涉及分离冷藏保存的TIL或UTIL的治疗性群体的方法,且涉及通过使用包含一次性无菌试剂盒的装置,以通过本文所描述的方法处理切除的肿瘤,而获得的或可获得的TIL及UTIL。

[0266] 总体而言,TIL最初获自患者肿瘤样品(“初级TIL”)且随后扩增成更大的群体,该更大的群体用于如本文所描述的进一步操纵、如本文所概述的冷藏保存、再刺激,且可选地评估作为TIL健康的指标的表型及代谢参数。

[0267] 患者肿瘤样品可使用本领域中已知的方法获得,一般通过手术切除、穿刺活检或用于获得含有肿瘤及TIL细胞的混合物的样品的其他方式。一般而言,肿瘤样品可来自任何实体肿瘤,包括原发性肿瘤、侵袭性肿瘤或转移性肿瘤。肿瘤样品亦可为液体肿瘤,诸如获自恶性血液病的肿瘤。实体肿瘤可为任何癌症类型,包括但不限于乳腺癌、卵巢癌、宫颈癌、胰脏癌、前列腺癌、大肠直肠癌、肺癌、脑癌、肾癌、胃癌及皮肤癌(包括但不限于鳞状细胞癌、基底细胞癌及黑色素瘤)。在一些实施例中,TIL获得自恶性黑色素瘤肿瘤,因为已报导这些肿瘤具有尤其高的TIL含量。

[0268] 生产一般涉及双阶段过程。在阶段1中,解剖初始肿瘤材料,置于具有解聚模块的无菌试剂盒中,酶消化和/或片段化,且使解聚模块中的肿瘤均质化,得到单细胞悬浮液。尽管均质化细胞可在无菌试剂盒内,在单独的富集模块中进一步纯化以移除组分(例如不再需要的试剂;细胞碎片;未解聚组织),细胞可直接冷藏保存以使起始材料稳定化以用于TIL制造及储存于无菌试剂盒的稳定化模块中,直至需要阶段2。阶段2一般涉及从切除的肿瘤起始材料生长TIL(2周),随后为TIL细胞的快速扩增过程(快速扩增方案“REP”-2周)。洗涤且收集最终产物,随后悬浮于缓冲盐水、8.5%HAS及10%DMSO中,且冷藏保存以形成固体无菌产物,其在输注之前以单次剂量形式解冻,无进一步修饰。

[0269] 对于治疗,存在可能有助于治疗活性的三个独立要素。核心要素为TIL,即肿瘤衍生的T细胞,它可以通过T细胞作为其正常功能的一部分使用的各种方法来靶向和消除肿瘤细胞。这些方法包括直接方法(即穿孔蛋白介导的细胞毒性)及间接方法(即细胞因子生产)。虽然小鼠模型表明干扰素 γ 的产生对于有效疗法至关重要,但并不明确这些方法中的哪一个对活体内抗肿瘤作用最重要。有助于疗法的两种其他要素为预处理化学疗法及高剂量静脉内IL-2。这两种要素被认为通过支持输注后患者中的T细胞的移植起作用:最初通过调节化学疗法,其移除竞争及调节免疫细胞;随后为支持T细胞存活的IL-2组分。

[0270] 细胞疗法产物的结构通过借助于生长支持细胞培养基及T细胞支持生长因子白介素-2 (IL-2),从酶消化的肿瘤块直接生长出TIL而产生。这使得肿瘤特异性T细胞能够选择性地存活且从肿瘤细胞混合物长出,而不识别肿瘤抗原的T细胞将不被刺激且被选择性地

丢失。产物包含基于自体T细胞的产物,其中T细胞已来源于患者自身的癌症组织且快速扩增以形成纯T细胞群体及如由CD3表面标记物所定义的T细胞。

[0271] 简而言之,TIL,尤其是UTIL,可在双阶段过程中使用肿瘤活检体作为起始材料产生:阶段1(通常经2至3小时进行)通过使用试剂盒及半自动装置,利用解剖、酶消化及均质化初始收集及处理肿瘤材料,以产生单细胞悬浮液,其可使用试剂盒的稳定化模块直接冷藏保存以稳定化起始材料以用于后续制造;及阶段2,其可在数天或数年后发生。阶段2可经4周进行,其可为连续的流程,从阶段1的产物解冻开始,然后从肿瘤起始材料生长TIL(约2周),随后是TIL细胞快速扩增的过程(约2周),以增加细胞量且因此增加剂量。将TIL,尤其是UTIL进行浓缩且在调配为细胞的液体悬浮液之前洗涤。无菌药品可在袋中冷藏保存,其将在静脉输液之前以单次剂量形式解冻,无进一步修饰。

[0272] 在一个实施例中,本发明的袋为收集袋和/或冷藏保存袋。袋及任何相关联导管可为大体上澄清、透明、半透明、任何所希望的颜色或其组合。组织收集袋和/或导管通常可通过类似于封闭和/或密封血液和/或冷藏保存袋及相关联导管的制造的方式制造。本发明中的导管可由任何所需材料构筑,包括但不限于聚氯乙烯(PVC)。举例而言,PVC可为所希望的材料,因为PVC有利于熔接和/或密封。

[0273] 收集袋,例如本发明的组织收集袋可包括由预定材料制成的用于接收组织的袋的至少一部分,该预定材料例如聚烯烃聚合物、乙烯醋酸乙烯酯(EVA)、共聚物(诸如乙酸乙烯酯及聚烯烃聚合物混合物(即OriGen Biomedical EVO膜))和/或包括EVA的材料。可针对特定特性和/或一系列特性选择供用于袋的材料,例如密封性(诸如热密封性)、透气性、柔性(例如低温柔性)、弹性(例如低温弹性)、耐化学性、光学透明度、生物兼容性(诸如细胞毒性)、溶血性活性、抗浸出性、具有低微粒。

[0274] 密封口可用能量(例如热)在使用期间形成以产生熔接区。在使用期间形成的密封口可具有在约2.5mm至约7.5mm范围内的宽度。一般而言,在将组织材料置放于袋140中之后形成密封口140且可具有约5mm的宽度。可使用密封剥离测试(即ASTM F88/F88M)和/或爆发测试(burst test)(即ASTM F1140/F1140M或ASTM F2051/F2054M)来测试密封的强度。

[0275] 在一些实施例中,当袋或柔性容器被适当密封且被置于用于处理和/或加工的装置内并进一步用夹具紧固时,其在使用期间耐受100牛顿的力。袋或柔性容器的实施例可经构筑,以当其被适当密封且被置于用于处理和/或加工的装置内并进一步用夹具紧固时,其在使用期间耐受75牛顿的力。

[0276] 当在柔性容器(例如袋,例如收集袋和/或冷藏保存袋)上形成密封口或熔接口时,取决于袋中所使用的材料,密封装置可用于在预定温度、压力及时间量下施加热和/或压力。举例而言,一些热封机可能需要施加热及压力约八秒。在8秒之后,可关断装置的热,然而,可额外施加2至3秒的压力。

[0277] 在一些实施例中,袋可具有在约10cm至约50cm范围内的长度。尤其地,用于本文所述的本发明的袋可具有在约15cm至约30cm范围内的长度。举例而言,袋可具有在约18cm至约22cm范围内的长度。

[0278] 一些导管可为可熔接的。可熔接导管可由聚合物材料制成,例如聚氯乙烯(PVC)。

[0279] 可在沿着导管的位置处使用阀,包括但不限于无针阀。在一些实施例中,袋可具有在约10cm至约40cm范围内的长度。尤其地,用于本文所述的本发明的袋可具有在约15cm至

约30cm范围内的长度。举例而言,袋可具有在约18cm至约22cm范围内的长度。

[0280] 冷藏保存袋可能需要适合于使用诸如二甲亚砜(“DMSO”)的冷藏保护剂的冷藏保存。在一些实施例中,冷藏保存袋可经构筑以使得袋可容纳在约5ml至约45ml范围内的材料体积。尤其地,冷藏保存袋可包括容纳在约10ml至约35ml范围内的材料体积。举例而言,一些实施例包括可容纳在约15ml至约30ml范围内的待储存材料体积的冷藏保存袋。冷藏保存袋可具有使得达成所希望的预定体积的大小。在一些实施例中,冷藏保存袋可具有在约4cm至约11cm范围内的宽度及在约10cm至约18cm范围内的长度。举例而言,冷藏保存袋可具有在约5.8cm至约9.8cm范围内的宽度及在约12cm至约16cm范围内的长度。尤其地,冷藏保存袋的一个实施例可具有约7.8cm的宽度及约14cm的长度。

[0281] 在使用之前,冷藏保存试剂盒和/或其特定组件可经灭菌。用于形成袋的材料可为可热密封的。在袋中使用的材料可包括但不限于聚合物,例如EVA、聚酰胺(例如尼龙)及其组合。开放袋可用于在使用密封口和/或夹具将袋密封之后进行处理和/或解聚。

[0282] 过滤器可为管道过滤器(inline filter)、血液过滤器(例如血液施用过滤器)、生物过滤器和/或管道结块移除过滤器(in-line clump removal filter)。过滤器可配置为从经处理的组织移除大于预定大小的材料以形成所希望的材料。举例而言,组织的团块可使用过滤器与解聚组织分离。尤其地,在过滤之后进入导管的组织组合物可具有平均大小小于约200 μ m的组分,从而形成所希望的材料。举例而言,所需材料可包括平均大小小于约170 μ m的肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)。

[0283] 过滤器可经选择,以使得从导管进入的经处理的组织组合物可被富集,使得在过滤器之后,在稳定化组件方向上流入导管中的所希望的材料具有大小在约15 μ m至约500 μ m范围内的组分。在一些实施例中,过滤器可配置为使得在过滤之后在稳定化组件方向上进入导管的组织组合物具有大小在约50 μ m至约300 μ m范围内的组分。举例而言,在一个实施例中,过滤器可配置为使得在过滤之后进入导管的组织组合物具有大小在约150 μ m至约200 μ m范围内的组分。

[0284] 在一些实施例中,富集组件的过滤器可从经处理的组织移除在约5 μ m至约200 μ m的预定大小范围之外的材料,以形成所希望的材料。举例而言,所希望的材料可包括平均大小在约5 μ m至约200 μ m范围内的TIL。可将阀置放在距收集袋预定距离处。举例而言,无针阀可被置于距收集袋约20cm处。可用阀(例如无针阀)将材料添加至收集袋。举例而言,可将酶培养基插入无针阀中,以便添加培养基至收集袋。待通过阀提供的材料包括,例如,肿瘤消化培养基和/或冷藏保护剂或冷藏保存培养基,例如DMSO和/或其溶液,例如55%DMSO及5%葡聚糖冷藏保存培养基(例如BloodStor 55-5)。

[0285] 注射器可用于分别通过无针阀290、292提供肿瘤消化培养基及55%DMSO溶液,例如55%DMSO及5%葡聚糖冷藏保存培养基。在处理期间,可在预定时间将材料选择性地提供至冷藏保存试剂盒。此外,夹具可用于控制所提供的材料(例如肿瘤消化培养基和/或冷藏保护剂)的流动,例如:DMSO溶液可在预定时间被提供至诸如收集袋、过滤器和/或冷藏保存袋的装置。

[0286] 在一些实施例中,在此类阀之后,可具有预定量的导管,以允许存在向冷藏保存试剂盒上熔接额外组件的空间。举例而言,在一些阀之后,至少十(10)cm的导管可被置于下一元件之前。导管199可为可密封和/或可熔接的。举例而言,用于导管的材料可包括但不限于

聚氯乙烯(PVC)和/或本领域中已知的其他材料。在一些实施例中,导管的尺寸可适配连接器。举例而言,导管可具有在约1.5mm至约4.5mm范围内的内径及在约2.1mm至约6.1mm范围内的外径。举例而言,冷藏保存试剂盒的实施例可包括内径在约2.9mm至约3.1mm范围内且外径在约4.0mm至约4.2mm范围内的导管。用于冷藏保存试剂盒191中的导管的长度可变化,其中单个导管组件的长度在约1cm至约30cm的范围内。

[0287] 夹具可用于阻止和/或防止酶培养基和/或经消化的组织移动至过滤器中。举例而言,夹具可用于阻止和/或防止酶培养基和/或经消化的组织在所希望的过滤步骤之前移动至过滤器中。另一夹具198阻止和/或防止冷藏保护剂不合期望地移动至过滤器中。

[0288] 在一个特定的实施例中,两个或更多个袋可耦接在一起以确保可恰当地储存解聚产物材料。

[0289] 在一些实施例中,本发明可包括用于半自动化无菌解聚、富集和/或稳定化来自组织(例如固体哺乳动物组织)的细胞和/或细胞聚集体的自动化装置。与本发明一起使用的自动化装置可包括可程序化处理器及冷藏保存试剂盒。在一些实施例中,冷藏保存试剂盒可为单次使用的。本发明进一步涉及半自动无菌组织处理方法。

[0290] 在一些实施例中,袋(例如收集袋)可用于收集试剂盒中。具有开口端的袋允许添加样品,例如组织样品。收集试剂盒中的连接器可将袋耦接于导管。导管材料可为可密封和/或可熔接的。举例而言,导管可使用能量(诸如热、射频等)密封。导管材料可由PVA制成。

[0291] 在一些实施例中,导管可与阀耦接以允许添加一种或多种培养基酶溶液,包括但不限于胶原蛋白酶、胰蛋白酶、脂肪酶、玻尿酸酶、脱氧核糖核酸酶、Liberase HI、胃蛋白酶或其混合物。举例而言,阀可为无针阀。用于冷藏保存试剂盒中的导管可包括外径在约3.0mm至约5.0mm范围内的导管,其中导管的内径在约2.0mm至约4mm范围内。尤其地,导管可具有 4.1 ± 0.1 mm的外径及约 3.0 ± 0.1 mm的内径。导管的长度可视收集试剂盒的配置而定。举例而言,收集试剂盒的一个实施例可包括长度在约10cm至约20cm范围内的导管。

[0292] 在收集试剂盒的一些实施例中,原型可包括一个或多个夹具以阻止和/或防止组织和/或酶培养基移动。尤其地,可阻止酶培养基和/或组织在过滤步骤之前移动至过滤器中。

[0293] 对于治疗存在可能有助于治疗活性的三个独立要素。核心要素为TIL,诸如UTIL,其具有通过多种机制消除肿瘤细胞的潜能,这些机制被T细胞利用,作为其正常功能的一部分。

[0294] 这些机制包括:直接细胞毒性,其通过[a]释放细胞毒素(例如穿孔蛋白、颗粒酶及颗粒溶素),其通过紧密接合进入目标细胞且诱发细胞死亡;及通过[b]T细胞与目标之间的细胞表面相互作用,诸如结合FAS配位体介导的细胞毒性诱发细胞凋亡;及间接方法(例如细胞因子生产),其能够募集且刺激二级效应细胞以参与及诱发肿瘤细胞死亡。

[0295] TIL,尤其是UTIL,为自体产物;因此,所制造的各批次提供特定患者的单次剂量。不存在子批次或批次池。药品为在解冻之后用于单次静脉输液的、在125-270mL之间的具有8.5%人类血清白蛋白及10%DMSO的基于生理盐水的溶液中冷藏保存的少量无菌制备T细胞(5×10^9 至 5×10^{10})批次。

[0296] 与美国专利第10,398,734号(“’734专利”)相比,本发明中存在若干优势。’734专利中的第一步骤为将肿瘤本体转化片段,从该片段培养TIL。与此相对,本发明从肿瘤释放

TIL,该肿瘤在切除之后在无菌条件下在无菌试剂盒中保存及解聚,自其制备细胞悬浮液,且通过冷冻,冷藏保存所得TIL。本发明提供表示肿瘤内部存在的多样性的多样化TIL群体。且因为其为均质悬浮液,所以在培养物中扩增的TIL将保留该多样性,此提供解决存在于肿瘤内的癌细胞的多样化群体的最大机会。

[0297] 与此相对,'734专利的制造过程开始于组织的片段,这些片段在装运及在开始处理之前的任何其他延迟期间已经经历内部细胞群体的劣化。另外,用于制造的TIL将仅为从组织片段扩增的TIL,且不为任何保留于内部中的TIL,以使得所得的细胞群体可能无法反映肿瘤环境的完全多样性。

[0298] 一个区别是,与'734专利的过程相比,本发明的过程中进入封闭制造过程发生得更快且污染机会更少。尤其地,在本申请中,肿瘤组织的破坏发生在封闭处理系统中,而非'734专利描述的在生物安全柜中的开放操作中发生的广泛的破碎过程。

[0299] 因为本发明的起始材料在无菌试剂盒中在无菌条件下保存,所以可对冷藏保存的肿瘤细胞悬浮液进行的完整制造过程可以高容量及效率安排且进行。相比之下,由于'734专利开始于未冷冻组织,因此片段化及“生长出”步骤是在候用(stand-by)基础上进行,具有较低容量利用效率。在'734专利中,移除此中间冷冻步骤总体缩短制造过程,但意味着整个过程在候用基础上进行,意味着制造停工时间对'734专利的制造设施具有显著影响,因为不能存在任何延迟,且计划制造的停工期将要求完成所有正在进行的产品并停止新的手术。

[0300] 本申请的过程的优势为:可在需要TIL疗法之前收集呈切除的肿瘤形式的组织,输送、处理、冷藏保存且储存于无菌试剂盒中直至且需要制造时,以便可对患有较早期疾病的患者,在其具有替代疗法的同时,进行收集及储存。因此,肿瘤收集及后续制造的时间或地理位置存在极小影响或无影响。而在'734专利中,这并不可能,且药品的完全制造必须在细胞可被冷冻及保存之前发生。

[0301] 如上文所提及,这些为极不同的培养过程,它们将产生不同的细胞群,从中开始REP培养,如接种REP培养物所需的极不同数目的细胞所反映的:100万至2000万(本发明)相对于2500万-2亿('734专利)。在本发明中,在初始TIL扩增期间,培养物接种使用细胞悬浮液(即从解聚和冷藏保存的细胞中生长出来的细胞,其将为驻留和新生(emergent)T细胞的混合物),而非从块中生长出来的(即新生细胞);这意味着REP不仅接种有新生T细胞。另外,本发明可利用固体及柔性封闭容器两者,其中柔性容器能够实现基于所衍生的肿瘤悬浮液(而非如'734专利中所定义的多个碎块)的量的更佳环境。

[0302] 使用标准手术实践在手术操作室内以手术方式移出转移性肿瘤材料。在解聚之前,移除额外材料(即如宏观上所定义的非肿瘤材料)且将肿瘤材料转移至无菌袋中。

[0303] 以下可涉及肿瘤起始材料验收测试。首先,来源组织经确认为肿瘤材料。其次,评估解聚组织的代表性样品的微生物负荷且其中当前抗生素敏感性经定义(制造可在抗生素风险下进行),但最终材料必须对微生物生长呈阴性。第三,可通过流式细胞术评估TIL及肿瘤细胞的数量及存活率。

[0304] 本发明的方法包含以下步骤:无菌解聚从对象切除的肿瘤,从而产生经解聚的肿瘤,其中若切除的肿瘤可在无细胞损伤下冷藏保存,则充分解聚。在一个有利实施例中,半自动装置的可程序化处理器可控制解聚,使得解聚柔性容器内的表面能够机械地挤压及剪

切固体组织(参见例如PCT公开号WO 2018/130845)。解聚表面可例如通过机械活塞控制。

[0305] 对于酶消化,使用DNA酶1及胶原蛋白酶(IV型)的酶混合物,从切除的转移性肿瘤产生细胞悬浮液(含有T细胞及肿瘤细胞两者)。重复机械压缩的组合暴露额外表面以供酶靠近,且酶反应使固体组织在可选的冷藏保存之前变成细胞悬浮液的过程加速。在一个实施例中,在解聚步骤完成后,临在受控速率冷冻循环之前添加基于DMSO的冷藏保护剂。在一些实施例中,固体组织的酶分解可通过选择及提供一种或多种培养基酶溶液进行,所述一种或多种培养基酶溶液诸如胶原蛋白酶、胰蛋白酶、脂肪酶、玻尿酸酶、脱氧核糖核酸酶、Liberase H1、胃蛋白酶或其任何混合物。切除的转移性肿瘤的酶消化可在半自动装置的解聚柔性容器中进行。

[0306] 举例而言,在本发明方法的另一个实施例中,分解过程补充有酶消化,用于酶消化的培养基制剂必须补充有有助于蛋白质分解导致细胞与细胞边界分解的酶。

[0307] 细胞培养或细胞处理技术中已知的各种液体制剂可作用于固体组织的细胞解聚及酶消化的液体制剂,包括但不限于以下培养基中的一个或多个:器官保存溶液、选择性溶解溶液、PBS、DMEM、HBSS、DPBS、RPMI、伊格尔培养基、XVIVO™、AIM-V™、乳酸林格氏液、林格氏乙酸盐溶液、生理盐水、PLASMALYTE™溶液、胶体溶液及IV流体、胶体溶液及IV流体、5%右旋糖水溶液(D5W)、哈特曼溶液DMEM、HBSS、DPBS、RPMI、AIM-V™、伊格尔培养基、XVIVO™,上述的每一个可以可选地补充有额外的细胞支持因子,例如胎牛血清、人类血清或血清替代物或其他养分或细胞因子以帮助细胞回收及存活或特定细胞枯竭。培养基可为标准细胞培养基,如以上提及的培养基,或用于例如原代人类细胞培养(例如用于内皮细胞、肝细胞或角质细胞)或干细胞(例如树突状细胞成熟、造血扩增、角质细胞、间叶干细胞或T细胞)的特殊培养基。培养基可具有本领域中公知的补充剂或试剂,例如白蛋白及转运蛋白、氨基酸及维生素、一种或多种金属离子、抗生素、连接因子、去连接因子、界面活性剂、生长因子及细胞因子、激素或增溶剂。各种培养基可商购自例如ThermoFisher、Lonza或Sigma-Aldrich或类似培养基制造商及供货商。

[0308] 酶消化所需的液体制剂必须具有以至少0.1mM至多50mM,最佳范围2至7mM,理想地5mM存在的足够钙离子。

[0309] 待消化的固体组织可在解聚之后用含有螯合剂EGTA及EDTA的液体制剂洗涤,以移除黏附因子及抑制性蛋白质,随后洗涤且移除EDTA及EGTA,随后酶消化。

[0310] 酶消化所需的液体制剂优选地具有最少的螯合剂EGTA及EDTA,其可通过移除酶稳定性及活性所需的钙离子而严重抑制酶活性。另外, β -巯基乙醇、半胱氨酸及8-羟基喹啉-5-磺酸酯为其他已知抑制性物质。

[0311] 使用解剖、酶消化及均质化处理肿瘤材料产生TIL(尤其是UTIL)的单细胞悬浮液,其可直接冷藏保存以稳定化供后续处理的起始材料,其用于通过TIL(尤其是UTIL)的细胞悬浮液在IL-2中的第一扩增以获得TIL(尤其是UTIL)的第一群体。

[0312] 该方法也包含冷藏保存经解聚的肿瘤(例如细胞悬浮液)的步骤。冷藏保存经解聚的肿瘤与进行无菌解聚从对象切除的肿瘤从而产生经解聚的肿瘤的步骤在同一天进行,其中若切除的肿瘤可在无细胞损伤下冷藏保存,则充分解聚。举例而言,冷藏保存在解聚肿瘤的步骤之后5、10、20、30、40、50、60、70、80或90分钟,或2、4、6、8、10、12、14、16、18、20或22小时进行。经解聚的肿瘤(作为在半自动装置的解聚模块中酶解聚获得的单细胞悬浮液)的冷

藏保存通过在8℃与至少-80℃或更低之间的温度下冷却和/或维持悬浮液来进行。解聚可快至5分钟,但最通常为45分钟至1小时,且冷藏保存可快至60分钟或高达150分钟。在一个实施例中,这些方法包括储存该冷藏保存的经解聚的肿瘤。如优选实施例中所描述,装置包含至少一个用于冷藏保存的细胞容器,其中容器为由弹性可变形材料制成的柔性容器。在装置的这个实施例中,最终容器直接转移至-20至-190℃或更低温度的冷冻器,或最佳地位于与装置相关联或分开供应的受控速率冷冻设备(由例如Planer Products或Asymptote有限公司制造)中,其中用于容纳富集解聚的固体组织容器的冷冻腔室及一个或多个柔性储存容器的温度通过以下控制:注入冷气(通常为氮气,例如Planer products);或通过从受控冷却表面移除热。两种方法使得能够以小于1℃或优选0.1℃的误差精确地基于冷冻溶液及产物的所期望的存活率控制待冷冻特定细胞所需的速率的冷冻过程。此冷藏保存过程必须考虑冰成核温度,其理想地尽可能接近于冷冻溶液的熔融温度。随后在水性溶液中晶体生长,水作为冰从系统移除,且残余未冷冻溶液的浓度增加。随着温度降低,更多冰形成,减少残余未冷冻部分,其导致浓度进一步增加。在水性溶液中,存在较大温度范围,其中冰与浓缩的水性溶液共存。最终通过温度降低,溶液达到玻璃化转变状态,此时冷冻溶液及细胞从黏稠溶液变为固体样状态,低于此温度细胞不会经历进一步的生物变化,并因此在数年(可能数十年)内稳定化,直至需要。

[0313] 冰成核及晶体生长涉及热量释放至冷冻溶液及细胞微环境,且希望的是保持细胞及冷冻溶液的冷却,即使在冷冻流体经历相变时抵抗温度变化时亦如此。取决于解聚是否包括酶解聚以及给定酶的酶消化的最佳温度、酶浓度及组织类型是什么,在冷藏保存开始时的温度包括但不限于40℃,39℃,38℃,37℃,36℃,35℃,34℃,33℃,32℃,31℃,30℃,29℃,28℃,27℃,26℃,25℃,24℃,23℃,22℃,21℃及20℃,即,在哺乳动物体温至室温范围内的温度,且进一步包括较低的冷藏温度,例如但不限于10℃、8℃、6℃、5℃、4℃、3℃及2℃。低温冷却的目标温度包括但不限于-60℃、-65℃、-70℃、-75℃、-80℃、-85℃、-90℃及其间温度以及低至液氮蒸气储存温度(-195.79℃)的更低温。在某些实施例中,根据本发明使用的方法及装置经设计或程序化,以使自生理温度或消化温度至低温储存温度的时间最小化。在某些实施例中,根据本发明的用于冷冻保存的方法和装置被有利地设计和编程用于在这样的条件下冷却:当介质结晶时,热量释放到、进入、至周围或在包括细胞的环境中被最小化或避免。在某些实施例中,方法经设计和/或装置经程序化以用于从解聚温度连续冷却降至低温目标温度。示例性程序化冷却速率包括但不限于-0.5℃/min、-1℃/min、-1.5℃/min、-2℃/min或-2.5℃/min。冷却速率为程序目标且可在冷却循环中变化。冷却速率可变化,例如变化±0.1℃/min、±0.2℃/min、±0.3℃/min、±0.4℃/min或±0.5℃/min。在本发明的一个实施例中,冷藏保存温度为-80℃±10℃且装置经程序化以将温度降低1℃/min或1.5℃/min或2℃/min或1℃/min±0.5℃/min或1.5℃/min±0.5℃/min或2℃/min±0.5℃/min。

[0314] 在一些实施例中,本发明的方法提供获得年轻TIL,其能够在向对象/患者施用提供增加的复制循环,且因此可提供优于更老的TIL(即在向对象/患者施用之前进一步经历更多轮复制的TIL)的额外治疗益处。年轻TIL的特征已描述于文献中,例如Donia等人, *Scandinavian Journal of Immunology*, 75:157-167 (2012); Dudley等人, *Clin Cancer Res*, 16:6122-6131 (2010); Huang等人, *J Immunother*, 28 (3):258-267 (2005); Besser等人,

Clin Cancer Res, 19 (17) :OF1-OF9 (2013); Besser等人, J Immunother 32:415-423 (2009); Robbins等人, J Immunol 2004; 173:7125-7130; Shen等人, J Immunother, 30:123-129 (2007); Zhou等人, J Immunother, 28:53-62 (2005); 及 Tran等人, J Immunother, 31:742-751 (2008), 其皆以全文引用的方式并入本文中。

[0315] T及B淋巴细胞的多样化抗原受体通过有限但大量的基因区段的体细胞重组产生。这些基因区段:可变(V)、多样性(D)、接合(J)及恒定(C), 确定免疫球蛋白及T细胞受体(TCR)的结合特异性及下游应用。本发明提供一种产生TIL的方法, 其展现且增加T细胞库多样性。在一些实施例中, 通过本发明的方法获得的TIL展现T细胞库多样性的增加。在一些实施例中, 相比起新鲜收集的TIL和/或使用除提供的方法以外的其他方法制备的TIL, 通过本发明方法获得的TIL展现T细胞库多样性的增加。在一些实施例中, 相比起新鲜收集的TIL和/或TIL, 通过本发明的方法获得的TIL展现T细胞库多样性的增加。在一些实施例中, 第一扩增中获得的TIL展现T细胞库多样性的增加。在一些实施例中, 多样性的增加为免疫球蛋白多样性和/或T细胞受体多样性的增加。在一些实施例中, 多样性在免疫球蛋白中处于免疫球蛋白重链中。在一些实施例中, 多样性在免疫球蛋白中处于免疫球蛋白轻链中。在一些实施例中, 多样性在T细胞受体中。在一些实施例中, 多样性为选自以下组成的组的T细胞受体中的一个: α 、 β 、 γ 及 δ 受体。在一些实施例中, T细胞受体(TCR) α 和/或 β 的表达增加。在一些实施例中, T细胞受体(TCR) α 的表达增加。在一些实施例中, T细胞受体(TCR) β 的表达增加。在一些实施例中, TCR $\alpha\beta$ (即TCR α/β) 的表达增加。

[0316] 本发明的方法也包含以下步骤: 通过在包含IL-2的细胞培养基中培养经解聚的肿瘤来进行第一扩增, 以产生TIL (尤其UTIL) 的第一群体。由上述步骤产生的细胞在相比起肿瘤和其他细胞, 更有利于TIL生长的条件下在含有IL-2的血清中培养。在一些实施例中, 在2mL孔中, 在包含具有6000IU/mL IL-2的灭活人类AB血清的培养基中培育肿瘤消化物。培养此原代细胞群体数天, 一般3至14天, 以产生本体TIL群体, 通常约 1×10^8 个本体TIL细胞。在一些实施例中, 培养此原代细胞群体7至14天时间, 产生本体TIL群体, 通常约 1×10^8 个本体TIL细胞。在一些实施例中, 培养此原代细胞群体10至14天时间, 产生本体TIL群体, 通常约 1×10^8 个本体TIL细胞。在一些实施例中, 培养此原代细胞群体约11天, 产生本体TIL群体, 通常约 1×10^8 个本体TIL细胞。

[0317] 在一个优选实施例中, TIL的扩增可使用如下文及本文所描述的初始本体TIL扩增步骤, 随后为下文及本文所描述的第二扩增 (包括快速扩增方案 (REP) 步骤, 随后为再刺激REP步骤)。

[0318] 在一个有利实施例中, 冷藏保存的经解聚的肿瘤组织解冻且1:9再悬浮于T细胞培养基 (为Immetacyte合同制造的T细胞培养基, 补充有以下添加剂: 10% FBS及3000IU/mL IL-2) 中, 随后通过管线100至270 μ m过滤器过滤且在50mL离心管中离心, 随后再悬浮于20mL中。可将样品用于流式细胞术分析, 以定量多种HLA-A、B、C及CD58⁺以及DRAQ7⁻细胞。在一些实施例中, 此可使用替代人工 (例如但不限于血球计) 或替代的自动化总活细胞计数装置 (例如但不限于NucleoCounterTM; Guava[®]; 自动化血液分析及计数器; 基于移液管的细胞计数器, 例如但不限于ScepterTM) 接种。

[0319] 在一个实施例中, 经再悬浮的、冷藏保存的经解聚的肿瘤组织在相对于肿瘤及其他细胞而言更促进TIL生长的条件下, 在含有IL-2的血清中培养。在一些实施例中, 将肿瘤

消化物在包含具有6000IU/mL IL-2的灭活人类AB血清(或在一些情况下,如本文所概述,在人工抗原呈递[aAPC]细胞群体存在下)的培养基中,在2mL孔中培育。培养此原代细胞群体数天,一般10至14天,以产生本体TIL群体,通常约 1×10^8 个本体TIL细胞。在一些实施例中,生长培养基在第一扩增期间包含IL-2或其变体。在一些实施例中,IL为重组人类IL-2(rhIL-2)。在一些实施例中,对于1mg小瓶,IL-2储备溶液具有20至 30×10^6 IU/mg的比活性。在一些实施例中,对于1mg小瓶,IL-2储备溶液具有 20×10^6 IU/mg的比活性。在一些实施例中,对于1mg小瓶,IL-2储备溶液具有 25×10^6 IU/mg的比活性。在一些实施例中,对于1mg小瓶,IL-2储备溶液具有 30×10^6 IU/mg的比活性。在一些实施例中,IL-2储备溶液的IL-2的最终浓度为 $4-8 \times 10^6$ IU/mg。在一些实施例中,IL-2储备溶液的IL-2的最终浓度为 $5-7 \times 10^6$ IU/mg。在一些实施例中,IL-2储备溶液的IL-2的最终浓度为 6×10^6 IU/mg。在一些实施例中,第一扩增培养基包含约10,000IU/mL IL-2、约9,000IU/mL IL-2、约8,000IU/mL IL-2、约7,000IU/mL IL-2、约6000IU/mL IL-2或约5,000IU/mL IL-2。在一些实施例中,第一扩增培养基包含约9,000IU/mL的IL-2至约5,000IU/mL的IL-2。在一些实施例中,第一扩增培养基包含约8,000IU/mL的IL-2至约6,000IU/mL的IL-2。在一些实施例中,第一扩增培养基包含约7,000IU/mL的IL-2至约6,000IU/mL的IL-2。在一些实施例中,第一扩增培养基包含约6,000IU/mL的IL-2。在一个实施例中,细胞培养基进一步包含IL-2。在一些实施例中,细胞培养基包含约3000IU/mL的IL-2。在一个实施例中,细胞培养基进一步包含IL-2。在一个优选实施例中,细胞培养基包含约3000IU/mL的IL-2。在一个实施例中,细胞培养基包含约1000IU/mL、约1500IU/mL、约2000IU/mL、约2500IU/mL、约3000IU/mL、约3500IU/mL、约4000IU/mL、约4500IU/mL、约5000IU/mL、约5500IU/mL、约6000IU/mL、约6500IU/mL、约7000IU/mL、约7500IU/mL或约8000IU/mL的IL-2。在一个实施例中,细胞培养基包含1000至2000IU/mL、2000至3000IU/mL、3000至4000IU/mL、4000至5000IU/mL、5000至6000IU/mL、6000至7000IU/mL、7000至8000IU/mL或约8000IU/mL的IL-2。

[0320] 在一些实施例中,第一扩增培养基包含约500IU/mL的IL-12、约400IU/mL的IL-12、约300IU/mL的IL-12、约200IU/mL的IL-12、约180IU/mL的IL-12、约160IU/mL的IL-12、约140IU/mL的IL-12、约120IU/mL的IL-12或约100IU/mL的IL-12。在一些实施例中,第一扩增培养基包含约500IU/mL的IL-12至约100IU/mL的IL-12。在一些实施例中,第一扩增培养基包含约400IU/mL的IL-12至约100IU/mL的IL-12。在一些实施例中,第一扩增培养基包含约300IU/mL的IL-12至约100IU/mL的IL-12。在一些实施例中,第一扩增培养基包含约200IU/mL的IL-12。在一些实施例中,细胞培养基包含约180IU/mL的IL-12。在一个实施例中,细胞培养基进一步包含IL-12。在一个优选的实施例中,细胞培养基包含约180IU/mL的IL-12。

[0321] 在一些实施例中,第一扩增培养基包含约500IU/mL的IL-15、约400IU/mL的IL-15、约300IU/mL的IL-15、约200IU/mL的IL-15、约180IU/mL的IL-15、约160IU/mL的IL-15、约140IU/mL的IL-15、约120IU/mL的IL-15或约100IU/mL的IL-15。在一些实施例中,第一扩增培养基包含约500IU/mL IL-15至约100IU/mL的IL-15。在一些实施例中,第一扩增培养基包含约400IU/mL IL-15至约100IU/mL的IL-15。在一些实施例中,第一扩增培养基包含约300IU/mL的IL-15至约100IU/mL的IL-15。在一些实施例中,第一扩增培养基包含约200IU/mL的IL-15。在一些实施例中,细胞培养基包含约180IU/mL的IL-15。在一个实施例中,细胞培养基进一步包含IL-15。在一个优选的实施例中,细胞培养基包含约180IU/mL的IL-15。

[0322] 在一些实施例中,第一扩增培养基包含约500IU/mL的IL-18、约400IU/mL的IL-18、约300IU/mL的IL-18、约200IU/mL的IL-18、约180IU/mL的IL-18、约160IU/mL的IL-18、约140IU/mL的IL-18、约120IU/mL的IL-18或约100IU/mL的IL-18。在一些实施例中,第一扩增培养基包含约500IU/mL的IL-18至约100IU/mL IL-18。在一些实施例中,第一扩增培养基包含约400IU/mL IL-18至约100IU/mL的IL-18。在一些实施例中,第一扩增培养基包含约300IU/mL的IL-18至约100IU/mL的IL-18。在一些实施例中,第一扩增培养基包含约200IU/mL的IL-18。在一些实施例中,细胞培养基包含约180IU/mL的IL-18。在一个实施例中,细胞培养基进一步包含IL-18。在一个优选的实施例中,细胞培养基包含约180IU/mL的IL-18。

[0323] 在一些实施例中,第一扩增培养基包含约20IU/mL的IL-21、约15IU/mL的IL-21、约12IU/mL的IL-21、约10IU/mL的IL-21、约5IU/mL的IL-21、约4IU/mL的IL-21、约3IU/mL的IL-21、约2IU/mL的IL-21、约1IU/mL的IL-21或约0.5IU/mL的IL-21。在一些实施例中,第一扩增培养基包含约20IU/mL的IL-21至约0.5IU/mL的IL-21。在一些实施例中,第一扩增培养基包含约15IU/mL IL-21至约0.5IU/mL IL-21。在一些实施例中,第一扩增培养基包含约12IU/mL的IL-21至约0.5IU/mL的IL-21。在一些实施例中,第一扩增培养基包含约10IU/mL的IL-21至约0.5IU/mL的IL-21。在一些实施例中,第一扩增培养基包含约5IU/mL的IL-21至约1IU/mL的IL-21。在一些实施例中,第一扩增培养基包含约2IU/mL的IL-21。在一些实施例中,细胞培养基包含约1IU/mL的IL-21。在一些实施例中,细胞培养基包含约0.5IU/mL的IL-21。在一个实施例中,细胞培养基进一步包含IL-21。在一个优选的实施例中,细胞培养基包含约1IU/mL的IL-21。

[0324] 培养基也考虑白介素的组合,例如但不限于IL-2、IL-12、IL-15、IL-18及IL-21。还考虑其他细胞因子,诸如IL-23、IL-27、IL-35、IL-39、IL-18、IL-36、IL-37、IL-38、IFN- α 、IFN- β 、IFN- γ 或其与IL-2、IL-12、IL-15、IL-18及IL-21的组合。亦考虑抗体,例如Th2阻断试剂,例如但不限于IL-4 (aIL4)、抗IL-4 (aIL4R)、抗IL-5R (aIL5R)、抗IL-5 (aIL5)、抗IL13R (aIL13R) 或抗IL13 (aIL13)。

[0325] 在一些实施例中,第一TIL扩增可进行1天、2天、3天、4天、5天、6天、7天、8天、9天、10天、11天、12天、13天或14天。在一些实施例中,第一TIL扩增可进行1天至14天。在一些实施例中,第一TIL扩增可进行2天至14天。在一些实施例中,第一TIL扩增可进行3天至14天。在一些实施例中,第一TIL扩增可进行4天至14天。在一些实施例中,第一TIL扩增可进行5天至14天。在一些实施例中,第一TIL扩增可进行6天至14天。在一些实施例中,第一TIL扩增可进行7天至14天。在一些实施例中,第一TIL扩增可进行8天至14天。在一些实施例中,第一TIL扩增可进行9天至14天。在一些实施例中,第一TIL扩增可进行10天至14天。在一些实施例中,第一TIL扩增可进行11天至14天。在一些实施例中,第一TIL扩增可进行12天至14天。在一些实施例中,第一TIL扩增可进行13天至14天。在一些实施例中,第一TIL扩增可进行14天。在一些实施例中,第一TIL扩增可进行1天至11天。在一些实施例中,第一TIL扩增可进行2天至11天。在一些实施例中,第一TIL扩增可进行3天至11天。在一些实施例中,第一TIL扩增可进行4天至11天。在一些实施例中,第一TIL扩增可进行5天至11天。在一些实施例中,第一TIL扩增可进行6天至11天。在一些实施例中,第一TIL扩增可进行7天至11天。在一些实施例中,第一TIL扩增可进行8天至11天。在一些实施例中,第一TIL扩增可进行9天至11天。在一些实施例中,第一TIL扩增可进行10天至11天。在一些实施例中,第一TIL扩增可进行11

天。

[0326] 在一些实施例中,IL-2、IL-7、IL-15和/或IL-21的组合在第一扩增期间作为组合采用。在一些实施例中,可在第一扩增期间包括IL-2、IL-7、IL-15和/或IL-21以及其任何组合。在一些实施例中,IL-2、IL-15及IL-21的组合在第一扩增期间作为组合采用。

[0327] 在一些实施例中,第一扩增系在封闭系统生物反应器中进行。在一些实施例中,如本文所描述,采用封闭系统进行TIL扩增。在一些实施例中,采用单一生物反应器。在一些实施例中,所采用的单一生物反应器为G-REX-10或G-REX-100的例子或有利地为WO 2018/130845的装置。在一些实施例中,封闭系统生物反应器为单一生物反应器。

[0328] 有利地,获自第一扩增的TIL群体(称为第二TIL群体)可经历第二扩增(其可包括有时称为REP的扩增)。类似地,在经遗传修饰的TIL将用于疗法的情况下,第一TIL群体(有时称为本体TIL群体)或第二TIL群体(其在一些实施例中可包括称为REP TIL群体的群体)可在扩增之前或在第一扩增之后及在第二扩增之前进行遗传修饰以用于适合治疗。

[0329] 慢病毒是有效的基因转移载体,因为它们能够转导分裂细胞和非分裂细胞。尽管得到最充分研究的慢病毒基因疗法载体衍生自1型人类免疫缺陷病毒(HIV),但也已研发基于其他灵长类动物及非灵长类动物慢病毒(包括HIV-2、SIV、猫免疫缺陷病毒(FIV)、马传染性贫血病毒(EIAV)、山羊关节炎脑炎病毒(CAEV)、维斯纳病病毒及Jembrana病病毒(JDV))的基因疗法载体。

[0330] 复制缺陷型病毒载体为预防患者感染潜在致命病毒所必需的。慢病毒载体已经研发以变得更安全且更有效。最新的第三代载体在移除所有辅助毒性及病原性的辅助基因的同时分开其余基因,其对于转基因在三种质体中的表达至关重要。参见例如美国专利公开2006/0024274。

[0331] EIAV基因转移载体被证明在活体外转导增殖及G₁抑制细胞中是有效的。Mitrophanous等人,1999.Stable gene transfer to the nervous system using a non-primate lentiviral vector.Gene Ther.6:1808-1818;Olsen,J.C.,1998,Gene transfer vectors derived from equine infectious anemia virus.Gene Ther.5:1481-1487;Olsen,J.C.,2001,EIAV,CAEV and Other Lentivirus Vector Systems,Somat Cell Mol Genet,第26卷,第1/6期,131-45。

[0332] Heemskerk,B.等人,2008,Adoptive cell therapy for patients with melanoma,using tumor-infiltrating lymphocytes genetically engineered to secrete interleukin-2.Human gene therapy,19(5),496-510描述经基因工程化以表达IL-2以延长TIL存活期的TIL。患者TIL在第一扩增期间用基于莫罗尼鼠类白血病病毒(Moloney murine leukemia virus,MMLV)的反转录病毒载体转染,随后进行第二扩增以获得足够数目以用于治疗。

[0333] 简而言之,含有来源于莫罗尼鼠类白血病病毒(MMLV)的MFG主链以及处于5'长末端重复序列(LTR)启动子的控制下的人类IL-2基因的cDNA复本的SBIL2载体在PG13封装细胞系中假型化,该细胞系提供长臂猿白血病病毒(GaLV)包膜蛋白。产生含有整合反转录病毒IL-2DNA的三个复本的稳定生产克隆(PG13SBIL2#3)。临床GMP级SBIL2反转录病毒上清液由Indiana University(Indianapolis,IN)的国立基因载体实验室(National Gene Vector Laboratory)产生。对于TIL转导,6孔非组织培养盘(Becton Dickinson, Franklin

Lakes, NJ) 涂布有重组人纤维蛋白 (Retronectin) (CH-296, 磷酸盐缓冲盐水 [PBS] 溶液中的 25 μ g/ml, GMP 级; Takara Bio, Otsu, Japan), 用 PBS-2% 人类血清白蛋白 (HSA) 阻断, 且在 32 $^{\circ}$ C 及 10% CO₂ 下用解冻的 SBIL2 病毒上清液 (5ml/孔) 预负载 4 小时。在 37 $^{\circ}$ C 及 5% CO₂ 下以 3ml/孔添加 TIL 持续 18-24 小时, 转移至第二组 SBIL2 负载盘, 再培养 18-24 小时, 然后收集 TIL 且将其再悬浮于新鲜培养基中。

[0334] Zhang, L. 等人, 2015, Tumor-infiltrating lymphocytes genetically engineered with an inducible gene encoding interleukin-12 for the immunotherapy of metastatic melanoma, *Clinical Cancer Research* 21(10), 2278-2288 描述经基因工程化以在肿瘤部位选择性地分泌 IL-12 的 TIL。TIL 经 MSGV1 γ -反转录病毒载体转导, 所述 MSGV1 γ -反转录病毒载体携有由活化 T 细胞核因子 (NFAT) 启动子驱动的、编码单链 IL-12 的基因。

[0335] MSGV-1 衍生自利用鼠类干细胞病毒长末端重复序列且含有延长的 gag 区及 Kozak 序列的 MSGV 载体。编码人类单链 IL-12 的基因由 NFAT 反应性启动子驱动, 以 IL-12p40、连接符 G6S 及 IL-12p35 的顺序合成, 且与 5' LTR 的方向所相反的方向插入至 MSGV-1 载体中。产生基于高效价 PG13 细胞的生产细胞系, 且反转录病毒上清液由 NCI Surgery Branch Vector Production Facility (Bethesda, MD) 在良好生产规范 (GMP) 条件下产生。对载体上清液进行测试, 且其通过了所有目前需要的、针对临床应用的重组 γ -反转录病毒载体的美国食品与药物管理局 (US Food and Drug Administration) 规范。

[0336] 通过以下程序启动转导程序: 用 30ng/ml 的抗 CD3 mAb Orthoclone OKT3 (Centocor Ortho Biotech, Raritan, NJ)、3000IU/ml 的重组人类 IL-12 及 4Gy 照射同种异体 PBMC 饲养细胞, 以每个 TIL 对应 200 个饲养细胞的比率刺激肿瘤浸润淋巴细胞 (TIL)。在第 4 天和/或第 5 天, 使用重组人纤维蛋白片段 (CH-296; Takara Bio 公司, Otsu, Japan) 涂布的非组织培养 6 孔盘收获细胞以用于转导。载体上清液通过在 2000g 下在 32 $^{\circ}$ C 下离心 2 小时“旋转装载”至经涂布盘上。从孔抽吸反转录病毒载体上清液, 且各孔添加 2×10^6 个经刺激的 TIL 细胞, 随后在 1000g 下离心 10 分钟。盘在 37 $^{\circ}$ C 下过夜培育, 且第二天收集细胞用于第 2 次转导。前 21 名患者的细胞经历两次转导。患者 12 的细胞仅经历一次转导。

[0337] Jones, S. 等人, 2009, Lentiviral vector design for optimal T cell receptor gene expression in the transduction of peripheral blood lymphocytes and tumor-infiltrating lymphocytes. *Human gene therapy*, 20(6), 630-640 描述开发用于慢病毒载体的启动子, 以在经转导的 T 淋巴细胞中表达基因及构筑有效抗肿瘤 T 细胞。

[0338] TIL 获自手术样本。PBL 从在 -180 $^{\circ}$ C 下储存的冷冻储备液解冻, 并以 300IU/ml, 在 AIM-V 及白介素-2 (IL-2; Cetus, Emeryville, CA) 中培养。对于 OKT3 刺激, 最初将细胞置于具有 50ng/ml 的抗 CD3 抗体 OKT3 (Ortho Biotech, Bridgewater, NJ) 的培养基中, 或在转导之后在培养基的初始更换时置于 OKT3 培养基中。对于 PBL 或 TIL 的转导, 在 24 孔组织培养处理盘中, 用病毒上清液及凝聚胺 (最终浓度, 8 μ g/ml) 将 1×10^6 个细胞调节至 1ml 的最终体积。通过在 1000 $\times$ g, 32 $^{\circ}$ C 下离心该盘 1.5 小时来转导细胞。将盘置放于 37 $^{\circ}$ C、潮湿的 5% CO₂ 培育器中过夜, 且次日替换培养基。对 TIL 进行如上文所述的快速扩增方案 (REP): 使用 OKT3 (50ng/ml)、IL-2 (5000IU/ml) 及来自三个不同供体的经照射的同种异体外周血单个核细胞 (TIL: 饲养细胞比率, 1:100)。REP 后六天, 如所描述的转导 TIL 且使其返回至培养基。

[0339] Beane, J.D. 等人, 2015, Clinical Scale Zinc Finger Nuclease-mediated Gene Editing of PD-1 in Tumor Infiltrating Lymphocytes for the Treatment of Metastatic Melanoma. Molecular therapy: 23 (8), 1380-1390 描述通过编码PD-1特异性锌指核酸酶 (ZFN) 介导的基因编辑的mRNA的电穿孔, 对PD-1进行临床规模的基因编辑。

[0340] 为了产生足够数目的经转导T细胞以用于过继细胞转移, 使用REP诱导TIL增殖。46 简言之, 将 1×10^7 个TIL与 1×10^9 个同种异体的、经照射 (5,000rad) 的外周血单个核细胞 (PBMC) 合并, 且将这些细胞悬浮于含有30ng/ml的OKT3的400ml的T细胞培养基中。在37℃及5%CO₂下, 在G-Rex100烧瓶中培养细胞。五天后, 抽吸且替换200ml培养基。在REP开始之后七天, 收集TIL且用Hyclone电穿孔缓冲剂 (Hyclone Laboratories, Logan, UT) 洗涤两次。随后对细胞进行计数, 且将该细胞以 1×10^8 /ml的浓度再悬浮于电穿孔缓冲剂中。细胞随后转移至MaxCyte CL-2处理装置 (assembly) 且与120μg/ml的PD-1ZFN mRNA (或GFP mRNA, 用于GFP转染的TIL/GFP) 混合。根据MaxCyte的说明书进行电穿孔。在电穿孔之后, 将TIL自处理装置转移至T-175烧瓶且置放于37℃下的培育器中20分钟。在此培育步骤之后, 将TIL以 1×10^6 /ml的浓度再悬浮于AIM-V培养基中。随后将细胞放置于设定为30℃的培育器中进行如之前所描述的过夜低温培育。第二天, 将TIL转移至37℃培育器中且保持其不受干扰直至REP第10天 (电穿孔后3天)。

[0341] 在一些实施例中, 储存从第一扩增获得的TIL, 直至表型分型以供选择。在一些实施例中, 从第一扩增获得的TIL未经储存且直接进行第二扩增。因此, 方法包含以下步骤: 通过与额外的IL-2、OKT-3及抗原呈递细胞 (APC) 一起培养TIL (尤其是UTIL) 的第一群体来进行第二扩增, 以产生TIL的第二群体。在一些实施例中, 从第一扩增获得的TIL在第一扩增之后及在第二扩增之前不冷藏保存。在一些实施例中, 第一扩增至第二扩增的转变在冷藏保存的经解聚的肿瘤组织解冻之后约3天、4天、5天、6天、7天、8天、9天、10天、11天、12天、13天或14天时发生。在一些实施例中, 在第一扩增至第二扩增的转变在冷藏保存的经解聚的肿瘤组织解冻之后约3天至21天时发生。在一些实施例中, 第一扩增至第二扩增的转变在冷藏保存的经解聚的肿瘤组织解冻之后约4天至14天时发生。在一些实施例中, 第一扩增至第二扩增的转变在冷藏保存的经解聚的肿瘤组织解冻之后约4天至10天时发生。在一些实施例中, 第一扩增至第二扩增的转变在冷藏保存的经解聚的肿瘤组织解冻之后约7天至14天时发生。在一些实施例中, 第一扩增至第二扩增的转变在冷藏保存的经解聚的肿瘤组织解冻之后约14天时发生。在一些实施例中, REP培养物的接种在冷藏保存的经解聚的肿瘤组织解冻之后3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20或21天时发生。

[0342] 在一些实施例中, 第一扩增至第二扩增的转变在冷藏保存的经解聚的肿瘤组织解冻之后1天、2天、3天、4天、5天、6天、7天、8天、9天、10天、11天、12天、13天或14天时发生。在一些实施例中, 第一扩增至第二扩增的转变在冷藏保存的经解聚的肿瘤组织解冻之后1天至14天时发生。在一些实施例中, 第一TIL扩增可进行2天至14天。在一些实施例中, 第一扩增至第二扩增的转变在冷藏保存的经解聚的肿瘤组织解冻之后3天至14天时发生。在一些实施例中, 第一扩增至第二扩增的转变在冷藏保存的经解聚的肿瘤组织解冻之后4天至14天时发生。在一些实施例中, 第一扩增至第二扩增的转变在冷藏保存的经解聚的肿瘤组织解冻之后5天至14天时发生。在一些实施例中, 第一扩增至第二扩增的转变在冷藏保存的经解聚的肿瘤组织解冻之后6天至14天时发生。在一些实施例中, 第一扩增至第二扩增的转变

在冷藏保存的经解聚的肿瘤组织解冻之后7天至14天时发生。在一些实施例中，第一扩增至第二扩增的转变在冷藏保存的经解聚的肿瘤组织解冻之后8天至14天时发生。在一些实施例中，第一扩增至第二扩增的转变在冷藏保存的经解聚的肿瘤组织解冻之后9天至14天时发生。在一些实施例中，第一扩增至第二扩增的转变在冷藏保存的经解聚的肿瘤组织解冻之后10天至14天时发生。在一些实施例中，第一扩增至第二扩增的转变在冷藏保存的经解聚的肿瘤组织解冻之后11天至14天时发生。在一些实施例中，第一扩增至第二扩增的转变在冷藏保存的经解聚的肿瘤组织解冻之后12天至14天时发生。在一些实施例中，第一扩增至第二扩增的转变在冷藏保存的经解聚的肿瘤组织解冻之后13天至14天时发生。在一些实施例中，第一扩增至第二扩增的转变在冷藏保存的经解聚的肿瘤组织解冻之后14天时发生。在一些实施例中，第一扩增至第二扩增的转变在冷藏保存的经解聚的肿瘤组织解冻之后1天至11天时发生。在一些实施例中，第一扩增至第二扩增的转变在冷藏保存的经解聚的肿瘤组织解冻之后2天至11天时发生。在一些实施例中，第一扩增至第二扩增的转变在冷藏保存的经解聚的肿瘤组织解冻之后3天至11天时发生。在一些实施例中，第一扩增至第二扩增的转变在冷藏保存的经解聚的肿瘤组织解冻之后4天至11天时发生。在一些实施例中，第一扩增至第二扩增的转变在冷藏保存的经解聚的肿瘤组织解冻之后5天至11天时发生。在一些实施例中，第一扩增至第二扩增的转变在冷藏保存的经解聚的肿瘤组织解冻之后6天至11天时发生。在一些实施例中，第一扩增至第二扩增的转变在冷藏保存的经解聚的肿瘤组织解冻之后7天至11天时发生。在一些实施例中，第一扩增至第二扩增的转变在冷藏保存的经解聚的肿瘤组织解冻之后8天至11天时发生。在一些实施例中，第一扩增至第二扩增的转变在冷藏保存的经解聚的肿瘤组织解冻之后9天至11天时发生。在一些实施例中，第一扩增至第二扩增的转变在冷藏保存的经解聚的肿瘤组织解冻之后10天至11天时发生。在一些实施例中，第一扩增至第二扩增的转变在冷藏保存的经解聚的肿瘤组织解冻之后11天时发生。

[0343] 在一些实施例中，TIL在第一扩增之后及在第二扩增之前不储存，且TIL直接继续进行第二扩增。在一些实施例中，如本文所描述，转变发生在封闭系统中。在一些实施例中，来自第一扩增的TIL，即TIL的第二群体，在无转变阶段的情况下直接继续进入第二扩增。

[0344] 在一些实施例中，第一扩增至第二扩增的转变系在封闭系统生物反应器中进行。在一些实施例中，如本文所描述，采用封闭系统进行TIL扩增。在一些实施例中，采用单一生物反应器。在一些实施例中，所用单一生物反应器为例如G-REX-10或G-REX-100或Xuri WAVE生物反应器。在一些实施例中，封闭系统生物反应器为单一生物反应器。

[0345] 在一些实施例中，在收集及初始本体处理之后，TIL细胞群体的数目扩增。此进一步扩增在本文中被称作第二扩增，其可包括在本领域中通常被称作“快速扩增过程”的扩增过程。第二扩增一般在透气或气体交换容器中使用培养基实现，该培养基包含多种组分，包括饲养细胞、细胞因子源及抗CD3抗体。

[0346] 在一些实施例中，TIL的第二扩增或第二TIL扩增可使用本领域技术人员所知晓的任何TIL培养瓶或容器进行。在一些实施例中，第二TIL扩增可进行7天、8天、9天、10天、11天、12天、13天或14天。在一些实施例中，第二TIL扩增可进行约7天至约14天。在一些实施例中，第二TIL扩增可进行约8天至约14天。在一些实施例中，第二TIL扩增可进行约9天至约14天。在一些实施例中，第二TIL扩增可进行约10天至约14天。在一些实施例中，第二TIL扩增可进行约11天至约14天。在一些实施例中，第二TIL扩增可进行约12天至约14天。在一些实

施例中,第二TIL扩增可进行约13天至约14天。在一些实施例中,第二TIL扩增可进行约14天。

[0347] 在一个实施例中,第二扩增可使用本发明的方法在透气容器中进行。举例而言,可使用非特异性T细胞受体刺激,在白介素-2 (IL-2) 或白介素-7 (IL-7) 或白介素-15 (IL-15)、IL-12存在下快速扩增TIL。非特异性T细胞受体刺激物可包括例如抗CD3抗体,诸如约30ng/ml的OKT3、小鼠单株抗CD3抗体(可购自Ortho-McNeil,Raritan,N.J.或Miltenyi Biotech,Auburn,Calif.)或UHCT-1(可购自BioLegend,San Diego,Calif.,USA)。通过在第二次扩增期间包含癌症的一种或多种抗原,可以扩增TIL以在体外诱导TIL的进一步刺激;所述抗原包括其抗原部分,例如表位;所述抗原可选地从载体表达,例如人类白血球抗原A2 (HLA-A2) 结合肽,例如0.3 μ M MART-1:26-35 (27L) 或gp100:209-217 (210M),可选地在T细胞生长因子(例如300IU/mL的IL-2或IL-15)的存在下。其它合适的抗原可包括,例如,NY-ESO-1、TRP-1、TRP-2、酪氨酸酶癌症抗原、MAGE-A3、SSX-2及VEGFR2或其抗原部分。TIL也可以通过用脉冲到表达HLA-A2的抗原呈递细胞上的相同癌症抗原再刺激来快速扩增。或者,TIL可进一步用例如经照射的自体淋巴细胞或用经照射的HLA-A2+同种异体淋巴细胞及IL-2再刺激。在一些实施例中,再刺激作为第二扩增的一部分发生。在一些实施例中,第二扩增在经照射的自体淋巴细胞或经照射的HLA-A2+同种异体淋巴细胞及IL-2的存在下进行。

[0348] 在一个实施例中,细胞培养基进一步包含IL-2。在一些实施例中,细胞培养基包含约3000IU/mL的IL-2。在一个实施例中,细胞培养基包含约100IU/mL、约200IU/mL、约300IU/mL、约400IU/mL、约500IU/mL、约600IU/mL、约700IU/mL、约800IU/mL、约900IU/mL、1000IU/mL、约1500IU/mL、约2000IU/mL、约2500IU/mL、约3000IU/mL、约3500IU/mL、约4000IU/mL、约4500IU/mL、约5000IU/mL、约5500IU/mL、约6000IU/mL、约6500IU/mL、约7000IU/mL、约7500IU/mL或约8000IU/mL的IL-2。在一个实施例中,细胞培养基包含1000至2000IU/mL、2000至3000IU/mL、3000至4000IU/mL、4000至5000IU/mL、5000至6000IU/mL、6000至7000IU/mL、7000至8000IU/mL或8000IU/mL的IL-2。

[0349] 在一个实施例中,细胞培养基包含OKT3抗体。在一些实施例中,细胞培养基包含约30ng/mL的OKT3抗体。在一个实施例中,细胞培养基包含约0.1ng/mL、约0.5ng/mL、约1ng/mL、约2.5ng/mL、约5ng/mL、约7.5ng/mL、约10ng/mL、约15ng/mL、约20ng/mL、约25ng/mL、约30ng/mL、约35ng/mL、约40ng/mL、约50ng/mL、约60ng/mL、约70ng/mL、约80ng/mL、约90ng/mL、约100ng/mL、约200ng/mL、约500ng/mL及约1 μ g/mL的OKT3抗体。在一个实施例中,细胞培养基包含0.1ng/mL至1ng/mL、1ng/mL至5ng/mL、5ng/mL至10ng/mL、10ng/mL至20ng/mL、20ng/mL至30ng/mL、30ng/mL至40ng/mL、40ng/mL至50ng/mL及50ng/mL至100ng/mL的OKT3抗体。

[0350] 在一些实施例中,IL-2、IL-7、IL-15和/或IL-21的组合在第二扩增期间作为组合采用。在一些实施例中,可在第二扩增期间包括IL-2、IL-7、IL-15和/或IL-21以及其任何组合。在一些实施例中,IL-2、IL-15及IL-21的组合在第二扩增期间作为组合采用。在一些实施例中,可包括IL-2、IL-15及IL-21以及其任何组合。

[0351] 在一些实施例中,第二扩增可在包含IL-2、OKT-3及抗原呈递饲养细胞的补充细胞培养基中进行。在一些实施例中,第二扩增发生于补充细胞培养基中。在一些实施例中,补充细胞培养基包含IL-2、OKT-3及抗原呈递饲养细胞。在一些实施例中,第二细胞培养基包

含IL-2、OKT-3及抗原呈递细胞(APC;亦称为抗原呈递饲养细胞)。在一些实施例中,第二扩增发生于包含IL-2、OKT-3及抗原呈递饲养细胞(即抗原呈递细胞)的细胞培养基中。

[0352] 在一些实施例中,第二扩增培养基包含约500IU/mL的IL-15、约400IU/mL的IL-15、约300IU/mL的IL-15、约200IU/mL的IL-15、约180IU/mL的IL-15、约160IU/mL的IL-15、约140IU/mL的IL-15、约120IU/mL的IL-15或约100IU/mL的IL-15。在一些实施例中,第二扩增培养基包含约500IU/mL的IL-15至约100IU/mL的IL-15。在一些实施例中,第二扩增培养基包含约400IU/mL的IL-15至约100IU/mL的IL-15。在一些实施例中,第二扩增培养基包含约300IU/mL的IL-15至约100IU/mL的IL-15。在一些实施例中,第二扩增培养基包含约200IU/mL的IL-15。在一些实施例中,细胞培养基包含约180IU/mL的IL-15。在一个实施例中,细胞培养基进一步包含IL-15。在一个优选的实施例中,细胞培养基包含约180IU/mL的IL-15。

[0353] 在一些实施例中,第二扩增培养基包含约20IU/mL的IL-21、约15IU/mL的IL-21、约12IU/mL的IL-21、约10IU/mL的IL-21、约5IU/mL的IL-21、约4IU/mL的IL-21、约3IU/mL的IL-21、约2IU/mL的IL-21、约1IU/mL的IL-21或约0.5IU/mL的IL-21。在一些实施例中,第二扩增培养基包含约20IU/mL的IL-21至约0.5IU/mL的IL-21。在一些实施例中,第二扩增培养基包含约15IU/mL的IL-21至约0.5IU/mL的IL-21。在一些实施例中,第二扩增培养基包含约12IU/mL IL-21至约0.5IU/mL IL-21。在一些实施例中,第二扩增培养基包含约10IU/mL的IL-21至约0.5IU/mL的IL-21。在一些实施例中,第二扩增培养基包含约5IU/mL的IL-21至约1IU/mL的IL-21。在一些实施例中,第二扩增培养基包含约2IU/mL的IL-21。在一些实施例中,细胞培养基包含约1IU/mL的IL-21。在一些实施例中,细胞培养基包含约0.5IU/mL的IL-21。在一个实施例中,细胞培养基进一步包含IL-21。在一个优选的实施例中,细胞培养基包含约1IU/mL的IL-21。

[0354] 在一些实施例中,抗原呈递饲养细胞(APC)为PBMC。在一个实施例中,在快速扩增和/或第二扩增中TIL与PBMC和/或抗原呈递细胞之比为约1:25、约1:50、约1:100、约1:125、约1:150、约1:175、约1:200、约1:225、约1:250、约1:275、约1:300、约1:325、约1:350、约1:375、约1:400或约1:500。在一个实施例中,在快速扩增和/或第二扩增中TIL与PBMC之比在1:50与1:300之间。在一个实施例中,在快速扩增和/或第二扩增中TIL与PBMC之比在1:100与1:200之间。

[0355] 在一个实施例中,REP和/或第二扩增在瓶中进行,其中将本体TIL与100倍或200倍过量的灭活饲养细胞、30mg/mL的OKT3抗CD3抗体及3000IU/mL的IL-2混合于150mL培养基中。进行培养基替换(通常通过抽吸,用新鲜培养基进行2/3培养基替换)直至细胞转移至替代的生长腔室。替代的生长腔室包括G-REX瓶及透气容器,如下文更充分论述的。

[0356] 在一些实施例中,第二扩增(其可包括被称为“REP过程”的过程)缩短至7至14天,如实施例及图中所讨论的。在一些实施例中,第二扩增缩短至11天。

[0357] 在一个实施例中,REP和/或第二扩增可使用如先前所描述的T-175瓶及透气袋(Tran等人,J.Immunother.2008,31,742-51;Dudley等人,J.Immunother.2003,26,332-42)或透气培养器(G-Rex瓶)进行。在一些实施例中,第二扩增(包括被称为“快速扩增”的扩增)在T-175瓶中进行,且可将悬浮于150mL培养基中约 1×10^6 个TIL添加至各T-175瓶中。TIL可在补充有3000IU/mL的IL-2及30ng/mL的抗CD3的、CM与AIM-V培养基的1:1混合物中培养。T-175瓶可在37℃下,在5%CO₂中培育。可在第5天使用具有3000IU/mL的IL-2的50/50培养基

更换一半培养基。在一些实施例中,在第7天,来自两个T-175瓶的细胞可在3L袋中合并,并将具有5%人类AB血清及3000IU/mL的IL-2的300mL的AIM V添加至300ml的TIL悬浮液中。每日或每两天对各袋中的细胞数目进行计数,并添加新鲜培养基以使细胞计数保持在 0.5 与 2.0×10^6 个细胞/毫升之间。

[0358] 在一个实施例中,第二扩增可在具有100cm透气硅底的500mL容量透气瓶(G-Rex 100,可购自Wilson Wolf Manufacturing Corporation,New Brighton,Minn.,USA)中进行, 5×10^6 或 10×10^6 个TIL可在补充有5%人类AB血清,3000IU/mL的IL-2及30ng/ml抗CD3(OKT3)的400mL的50/50培养基中与PBMC一起培养。G-Rex 100瓶可在37℃下,在5%CO₂中培育。在第5天,可移出250mL上清液且将其置放于离心瓶中且以1500rpm (491×g)离心10分钟。TIL团粒可用150mL具有5%人类AB血清、3000IU/mL IL-2的新鲜培养基再悬浮,且加回原始G-Rex 100瓶中。当TIL在G-Rex 100瓶中连续扩增时,在第7天各G-Rex 100中的TIL可悬浮于各烧瓶中存在的300mL培养基中,且细胞悬浮液可分成可用于接种3个G-Rex100烧瓶的3个100mL等分试样。随后可将150mL具有5%人类AB血清及3000IU/mL的IL-2的AIM-V添加至各烧瓶中。G-Rex 100瓶可在37℃下,在5%CO₂中培育,且在4天之后,可将具有3000IU/mL的IL-2的150mL的AIM-V添加至各G-REX 100瓶中。可在培养第14天收获细胞。

[0359] 在一个实施例中,第二扩增(包括被称为REP的扩增)在瓶中进行,其中将本体TIL与100倍或200倍过量的灭活饲养细胞、30mg/mL的OKT3抗CD3抗体及3000IU/mL的IL-2混合于150ml培养基中。在一些实施例中,进行培养基替换直至细胞转移至替代的生长腔室。在一些实施例中,通过抽吸,用新鲜培养基替换2/3培养基。在一些实施例中,替代的生长腔室包括G-REX瓶及透气容器,如下文更充分论述的。

[0360] 在一个实施例中,进行第二扩增(包括称为REP的扩增)且进一步包含针对优良肿瘤反应性选择TIL的步骤。可使用本领域中已知的任何选择方法。举例而言,美国专利申请公开第2016/0010058A1号中所述的方法可用于针对优良肿瘤反应性选择TIL。

[0361] 可选地,细胞存活率分析可在第二扩增(包括称为REP扩增的扩增)之后使用本领域中已知的标准分析进行。举例而言,台盼蓝排除分析可在本体TIL的样品上进行,其选择性地标记死细胞且允许评估存活率。在一些实施例中,可使用Cellometer K2自动化细胞计数器(Nexcelom Bioscience, Lawrence, Mass.)对TIL样品进行计数及存活率测定。

[0362] 在一些实施例中,TIL的第二扩增(包括被称为REP的扩增)可使用如之前所描述的T-175瓶及透气袋(Tran K Q、Zhou J、Durflinger K H等人,2008,J Immunother.,31:742-751,及Dudley M E、Wunderlich J R、Shelton T E等人,2003,J Immunother.,26:332-342)或透气G-Rex瓶进行。在一些实施例中,第二扩增使用瓶进行。在一些实施例中,第二扩增使用透气G-Rex瓶进行。在一些实施例中,第二扩增在T-175瓶中进行,且将约 1×10^6 个TIL悬浮于约150mL培养基中且将其添加至各T-175瓶中。TIL与作为“喂养”细胞的、经照射(50Gy)的同种异体PBMC一起,以1:100之比共同培养且细胞在补充有3000IU/mL的IL-2及30ng/mL抗CD3的CM与AIM-V培养基的1:1混合物(50/50培养基)中培养。T-175瓶在37℃下、5%CO₂中培育。在一些实施例中,在第5天使用具有3000IU/mL IL-2的50/50培养基更换一半培养基。在一些实施例中,在第7天,来自2个T-175瓶的细胞在3L袋中合并,且将具有5%人类AB血清及3000IU/mL的IL-2的300mL AIM-V添加至300mL的TIL悬浮液中。可每日或每两天对各袋中的细胞数目进行计数,且可添加新鲜培养基以使细胞计数保持在约0.5与约2.0

$\times 10^6$ 个细胞/毫升之间。

[0363] 在一些实施例中,第二扩增(包括称为REP的扩增)在具有 100cm^2 透气硅底的500mL容量瓶(G-Rex 100,Wilson Wolf)中进行,约 5×10^6 或 10×10^6 个TIL在补充有3000IU/mL的IL-2及30ng/ml抗CD3的400mL50/50培养基中与经照射同种异体PBMC以1:100之比一起培养。G-Rex 100瓶在 37°C 下、5% CO_2 中培育。在一些实施例中,在第5天,移出250mL上清液,放置于离心瓶中,并以1500rpm (491g) 离心10分钟。TIL团粒可随后用具有3000IU/mL的IL-2的150mL新鲜50/50培养基再悬浮,且添加至原始的G-Rex 100烧瓶中。在TIL于G-Rex 100瓶中连续扩增的实施例中,在第7天,各G-Rex 100中的TIL被悬浮于各烧瓶中存在的300mL培养基中,且细胞悬浮液分成用于接种3个G-Rex 100瓶的三个100mL等分试样。随后将150mL具有5%人类AB血清及3000IU/mL的IL-2的AIM-V添加至各瓶中。G-Rex 100烧瓶在 37°C 下、5% CO_2 中培育,在4天之后,将具有3000IU/mL的IL-2的150mL AIM-V添加至各G-REX 100瓶中。在培养第14天收集细胞。

[0364] T及B淋巴细胞的多样化抗原受体通过有限但大量基因区段的体细胞重组产生。这些基因区段:可变(V)、多样性(D)、接合(J)及恒定(C),决定免疫球蛋白及T细胞受体(TCR)的结合特异性及下游应用。本发明提供一种产生展现且增加T细胞库多样性的TIL的方法。在一些实施例中,通过本发明方法获得的TIL展现T细胞库多样性的增加。在一些实施例中,第二扩增中获得的TIL展现T细胞库多样性的增加。在一些实施例中,多样性的增加为免疫球蛋白多样性和/或T细胞受体多样性的增加。在一些实施例中,多样性在免疫球蛋白中处于免疫球蛋白重链中。在一些实施例中,多样性在免疫球蛋白中处于免疫球蛋白轻链中。在一些实施例中,多样性在T细胞受体中。在一些实施例中,多样性在选自由以下T细胞受体组成的组中的一个中: α 、 β 、 γ 及 δ 受体。在一些实施例中,T细胞受体(TCR) α 和/或 β 的表达增加。在一些实施例中,T细胞受体(TCR) α 的表达增加。在一些实施例中,T细胞受体(TCR) β 的表达增加。在一些实施例中,TCRab(即TCR α/β)的表达增加。

[0365] 在一些实施例中,第二扩增培养基(例如有时称为CM2或第二细胞培养基)包含IL-2、OKT-3,以及抗原呈递饲养细胞(APC)。

[0366] 在一些实施例中,第二扩增在封闭系统生物反应器中进行。在一些实施例中,如本文所描述,采用封闭系统进行TIL扩增。在一些实施例中,采用单一生物反应器。在一些实施例中,所采用的单一生物反应器为例如G-REX-10或G-REX-100或有利地为WO 2018/130845的装置。在一些实施例中,封闭系统生物反应器为单一生物反应器。

[0367] 在一个实施例中,本文所述的第二扩增程序以及称为REP的程序在REP TIL扩增期间和/或在第二扩增期间需要过量的饲养细胞。在许多实施例中,饲养细胞获取自健康血液供体的标准全血单元的外周血单个核细胞(PBMC)。PBMC使用标准方法(例如Ficoll-Paque梯度分离)获得。

[0368] 一般而言,同种异体PBMC通过照射或热处理灭活,且用于REP程序,其提供用于评价经照射的同种异体PBMC的复制无能(replication incompetence)的示例性方案。

[0369] 在一些实施例中,若第14天时活细胞的总数目小于在REP的第0天和/或第二扩增的第0天(即第二扩增的开始日)置入培养的初始活细胞数目,则PBMC视为复制无能且被接受用于本文所述的TIL扩增程序。

[0370] 在一些实施例中,若在OKT3及IL-2的存在下培养,第7天及第14天活细胞的总数目

相较于在REP的第0天和/或第二扩增的第0天(即第二扩增的开始日)置入培养的初始活细胞数目未增加,则PBMC视为复制无能且被接受用于本文所述的TIL扩增程序。在一些实施例中,PBMC在30ng/ml的OKT3抗体及3000IU/ml的IL-2存在下培养。

[0371] 在一些实施例中,若在OKT3及IL-2的存在下培养,第7天及第14天活细胞的总数目相较于在REP的第0天和/或第二扩增的第0天(即第二扩增的开始日)置入培养的初始活细胞数目未增加,则PBMC视为复制无能且被接受用于本文所述的TIL扩增程序。在一些实施例中,PBMC在5至60ng/ml的OKT3抗体及1000至6000IU/ml的IL-2存在下培养。在一些实施例中,PBMC在10至50ng/ml的OKT3抗体及2000至5000IU/ml的IL-2的存在下培养。在一些实施例中,PBMC在20至40ng/ml OKT3抗体及2000至4000IU/ml的IL-2存在下培养。在一些实施例中,PBMC在25至35ng/ml的OKT3抗体及2500至3500IU/ml的IL-2存在下培养。

[0372] 在一些实施例中,抗原呈递饲养细胞为PBMC。在一些实施例中,抗原呈递饲养细胞为人工抗原呈递饲养细胞。在一个实施例中,第二扩增中TIL与抗原呈递饲养细胞之比为约1:25、约1:50、约1:100、约1:125、约1:150、约1:175、约1:200、约1:225、约1:250、约1:275、约1:300、约1:325、约1:350、约1:375、约1:400或约1:500。在一个实施例中,第二扩增中TIL与抗原呈递饲养细胞之比在1:50与1:300之间。在一个实施例中,第二扩增中TIL与抗原呈递饲养细胞之比在1:100与1:200之间。

[0373] 在一个实施例中,本文所述的第二扩增程序需要约 2.5×10^9 个饲养细胞:约 100×10^6 个TIL之比。在另一个实施例中,本文所述的第二扩增程序需要约 2.5×10^9 个饲养细胞:约 50×10^6 个TIL之比。在又一个实施例中,本文所述的第二扩增程序需要约 2.5×10^9 个饲养细胞:约 25×10^6 个TIL。

[0374] 在一个实施例中,本文所述的第二扩增程序在第二扩增期间需要过量饲养细胞。在许多实施例中,饲养细胞为获自健康血液供体的标准全血单元的外周血单个核细胞(PBMC)。PBMC使用标准方法,例如Ficoll-Paque梯度分离获得。在一个实施例中,使用人工抗原呈递(aAPC)细胞代替PBMC。

[0375] 一般而言,同种异体PBMC通过照射或热处理灭活,且用于TIL扩增程序。

[0376] 在一个实施例中,人工抗原呈递细胞代替PBMC或与PBMC组合用于第二扩增中。

[0377] 本文所述的扩增方法通常使用具有高剂量的细胞因子(尤其是IL-2)的培养基,如本领域中已知的。

[0378] 或者,另外有可能的是使用细胞因子组合用于快速扩增和/或第二扩增TIL,其中IL-2、IL-15及IL-21中的两个或更多的组合如国际公开号WO 2015/189356及国际公开号WO 2015/189357中所大体概述,这些文献以全文引用的方式明确并入本文中。因此,可能的组合包括IL-2及IL-15、IL-2及IL-21、IL-15及IL-21以及IL-2、IL-15及IL-21,其中后者在许多实施例中得到特定使用。使用细胞因子的组合尤其有利于产生淋巴细胞,且尤其如本文所述的T细胞。

[0379] 在一些实施例中,本文所述的扩增方法(包括称为REP的扩增方法)中所用的培养基也包括抗CD3抗体。抗CD3抗体与IL-2的组合在TIL群体中诱导T细胞活化及细胞分裂。在全长抗体以及Fab及F(ab')₂片段的情况下可见此作用,其中前者通常为优选的;参见例如Tsoukas等人,J.Immunol.1985,135,1719,以全文引用的方式并入本文中。

[0380] 如本领域人员应了解的,存在多种适用于本发明的抗人类CD3抗体,包括来自各种

哺乳动物的抗人类CD3多克隆及单克隆抗体,包括但不限于鼠类、人类、灵长类动物、大鼠及犬类抗体。在特定实施例,使用OKT3抗CD3抗体(可购自Ortho-McNeil,Raritan,N.J.或Miltenyi Biotech,Auburn,Calif.)。

[0381] 在第二扩增步骤之后,可收集细胞。在一些实施例中,在一个、两个、三个、四个或更多个扩增步骤之后收集TIL。在一些实施例中,在两个扩增步骤之后收集TIL。

[0382] 可以任何适当及无菌方式收集TIL,包括例如通过离心。TIL收集方法为本领域中熟知的且任何此类已知方法均可与本发明的方法一起使用。在一些实施例中,使用自动化系统收集TIL。

[0383] 细胞收集器和/或细胞处理系统可购自多种来源,包括例如Fresenius Kabi、Tomtec Life Science、Perkin Elmer及Inotech Biosystems International公司。任何基于细胞的收集器可与本发明方法一起使用。在一些实施例中,细胞收集器和/或细胞处理系统为基于膜的细胞收集器。在一些实施例中,细胞收集系通过细胞处理系统,例如LOVO系统(由Fresenius Kabi制造)。术语“LOVO细胞处理系统”还指由任何供货商制造的任何仪器或装置,其可于无菌和/或封闭系统环境中将包含细胞的溶液泵送通过膜或过滤器(例如旋转膜或旋转过滤器),从而允许连续流动及细胞处理以移除上清液或细胞培养基而不发生团粒化。在一些实施例中,细胞收集器和/或细胞处理系统可在封闭无菌系统中进行细胞分离、洗涤、流体交换、浓缩和/或其他细胞处理步骤。

[0384] 在一些实施例中,所述收集从封闭系统生物反应器进行。在一些实施例中,如本文所描述,采用封闭系统进行TIL扩增。在一些实施例中,采用单一生物反应器。在一些实施例中,所采用的单一生物反应器为例如G-REX-10或G-REX-100或有利地为WO 2018/130845的装置。在一些实施例中,封闭系统生物反应器为单一生物反应器。

[0385] 细胞转移至容器以用于向患者施用。在一些实施例中,一旦使用上文所描述的扩增方法获得治疗充足数目的TIL,则将其转移至容器中以用于向患者施用。

[0386] 在一个实施例中,以医药组合物形式向患者施用使用本发明的APC扩增的TIL。在一个实施例中,医药组合物为TIL在无菌缓冲剂中的悬浮液。使用本发明的PBMC扩增的TIL可通过本领域中已知的任何合适途径施用。在一些实施例中,T细胞以单次动脉内或静脉输液形式施用,其优选持续大约30至60分钟。其他合适的施用途径包括腹膜内、鞘内及淋巴管内。

[0387] 在一个实施例中,使用本发明的方法扩增的TIL以医药组合物形式向患者施用。在一个实施例中,医药组合物为TIL在无菌缓冲剂中的悬浮液。使用本发明的PBMC扩增的TIL可通过本领域中已知的任何适合途径施用。在一些实施例中,T细胞以单次动脉内或静脉输液形式施用,其优选持续大约30至60分钟。其他合适的施用途径包括腹膜内、鞘内及淋巴管内施用。

[0388] 可施用任何适合剂量的TIL。在一些实施例中,施用约 2.3×10^{10} 至约 13.7×10^{10} 个TIL,平均约 7.8×10^{10} 个TIL,尤其在癌症为黑色素瘤的情况下。在一个实施例中,施用约 1.2×10^{10} 至约 4.3×10^{10} 个TIL。在一些实施例中,施用约 3×10^{10} 至约 12×10^{10} 个TIL。在一些实施例中,施用约 4×10^{10} 至约 10×10^{10} 个TIL。在一些实施例中,施用约 5×10^{10} 至约 8×10^{10} 个TIL。在一些实施例中,施用约 6×10^{10} 至约 8×10^{10} 个TIL。在一些实施例中,施用约 7×10^{10} 至约 8×10^{10} 个TIL。在一些实施例中,治疗有效剂量为约 2.3×10^{10} 至约 13.7×10^{10} 。在一些实

施例中,治疗有效剂量为约 7.8×10^{10} 个TIL,尤其在癌症为黑色素瘤的情况下。在一些实施例中,治疗有效剂量为约 1.2×10^{10} 至约 4.3×10^{10} 个TIL。在一些实施例中,治疗有效剂量为约 3×10^{10} 至约 12×10^{10} 个TIL。在一些实施例中,治疗有效剂量为约 4×10^{10} 至约 10×10^{10} 个TIL。在一些实施例中,治疗有效剂量为约 5×10^{10} 至约 8×10^{10} 个TIL。在一些实施例中,治疗有效剂量为约 6×10^{10} 至约 8×10^{10} 个TIL。在一些实施例中,治疗有效剂量为约 7×10^{10} 至约 8×10^{10} 个TIL。

[0389] 在一些实施例中,本发明的医药组合物中所提供的TIL的数目为约 1×10^6 、 2×10^6 、 3×10^6 、 4×10^6 、 5×10^6 、 6×10^6 、 7×10^6 、 8×10^6 、 9×10^6 、 1×10^7 、 2×10^7 、 3×10^7 、 4×10^7 、 5×10^7 、 6×10^7 、 7×10^7 、 8×10^7 、 9×10^7 、 1×10^8 、 2×10^8 、 3×10^8 、 4×10^8 、 5×10^8 、 6×10^8 、 7×10^8 、 8×10^8 、 9×10^8 、 1×10^9 、 2×10^9 、 3×10^9 、 4×10^9 、 5×10^9 、 6×10^9 、 7×10^9 、 8×10^9 、 9×10^9 、 1×10^{10} 、 2×10^{10} 、 3×10^{10} 、 4×10^{10} 、 5×10^{10} 、 6×10^{10} 、 7×10^{10} 、 8×10^{10} 、 9×10^{10} 、 1×10^{11} 、 2×10^{11} 、 3×10^{11} 、 4×10^{11} 、 5×10^{11} 、 6×10^{11} 、 7×10^{11} 、 8×10^{11} 、 9×10^{11} 、 1×10^{12} 、 2×10^{12} 、 3×10^{12} 、 4×10^{12} 、 5×10^{12} 、 6×10^{12} 、 7×10^{12} 、 8×10^{12} 、 9×10^{12} 、 1×10^{13} 、 2×10^{13} 、 3×10^{13} 、 4×10^{13} 、 5×10^{13} 、 6×10^{13} 、 7×10^{13} 、 8×10^{13} 及 9×10^{13} 。在一个实施例中,本发明的医药组合物中所提供的TIL的数目在以下范围内: 1×10^6 至 5×10^6 、 5×10^6 至 1×10^7 、 1×10^7 至 5×10^7 、 5×10^7 至 1×10^8 、 1×10^8 至 5×10^8 、 5×10^8 至 1×10^9 、 1×10^9 至 5×10^9 、 5×10^9 至 1×10^{10} 、 1×10^{10} 至 5×10^{10} 、 5×10^{10} 至 1×10^{11} 、 5×10^{11} 至 1×10^{12} 、 1×10^{12} 至 5×10^{12} 及 5×10^{12} 至 1×10^{13} 。

[0390] 在一些实施例中,本发明的医药组合物中所提供的TIL的浓度小于例如医药组合物的100%、90%、80%、70%、60%、50%、40%、30%、20%、19%、18%、17%、16%、15%、14%、13%、12%、11%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%、0.5%、0.4%、0.3%、0.2%、0.1%、0.09%、0.08%、0.07%、0.06%、0.05%、0.04%、0.03%、0.02%、0.01%、0.009%、0.008%、0.007%、0.006%、0.005%、0.004%、0.003%、0.002%、0.001%、0.0009%、0.0008%、0.0007%、0.0006%、0.0005%、0.0004%、0.0003%、0.0002%或0.0001%w/w、w/v或v/v。

[0391] 在一些实施例中,本发明的医药组合物中所提供的TIL的浓度大于医药组合物的90%、80%、70%、60%、50%、40%、30%、20%、19.75%、19.50%、19.25%19%、18.75%、18.50%、18.25%18%、17.75%、17.50%、17.25%17%、16.75%、16.50%、16.25%16%、15.75%、15.50%、15.25%15%、14.75%、14.50%、14.25%14%、13.75%、13.50%、13.25%13%、12.75%、12.50%、12.25%12%、11.75%、11.50%、11.25%11%、10.75%、10.50%、10.25%10%、9.75%、9.50%、9.25%9%、8.75%、8.50%、8.25%8%、7.75%、7.50%、7.25%7%、6.75%、6.50%、6.25%6%、5.75%、5.50%、5.25%5%、4.75%、4.50%、4.25%、4%、3.75%、3.50%、3.25%、3%、2.75%、2.50%、2.25%、2%、1.75%、1.50%、1.25%、1%、0.5%、0.4%、0.3%、0.2%、0.1%、0.09%、0.08%、0.07%、0.06%、0.05%、0.04%、0.03%、0.02%、0.01%、0.009%、0.008%、0.007%、0.006%、0.005%、0.004%、0.003%、0.002%、0.001%、0.0009%、0.0008%、0.0007%、0.0006%、0.0005%、0.0004%、0.0003%、0.0002%或0.0001%w/w、w/v或v/v。

[0392] 在一些实施例中,本发明的医药组合物中所提供的TIL的浓度在以下范围内:医药组合物的约0.0001%至约50%、约0.001%至约40%、约0.01%至约30%、约0.02%至约

29%、约0.03%至约28%、约0.04%至约27%、约0.05%至约26%、约0.06%至约25%、约0.07%至约24%、约0.08%至约23%、约0.09%至约22%、约0.1%至约21%、约0.2%至约20%、约0.3%至约19%、约0.4%至约18%、约0.5%至约17%、约0.6%至约16%、约0.7%至约15%、约0.8%至约14%、约0.9%至约12%或约1%至约10%w/w、w/v或v/v。

[0393] 在一些实施例中,本发明的医药组合物中所提供的TIL的浓度在以下范围内:医药组合物的约0.001%至约10%、约0.01%至约5%、约0.02%至约4.5%、约0.03%至约4%、约0.04%至约3.5%、约0.05%至约3%、约0.06%至约2.5%、约0.07%至约2%、约0.08%至约1.5%、约0.09%至约1%、约0.1%至约0.9%w/w、w/v或v/v。

[0394] 在一些实施例中,本发明的医药组合物中所提供的TIL的量等于或小于10g、9.5g、9.0g、8.5g、8.0g、7.5g、7.0g、6.5g、6.0g、5.5g、5.0g、4.5g、4.0g、3.5g、3.0g、2.5g、2.0g、1.5g、1.0g、0.95g、0.9g、0.85g、0.8g、0.75g、0.7g、0.65g、0.6g、0.55g、0.5g、0.45g、0.4g、0.35g、0.3g、0.25g、0.2g、0.15g、0.1g、0.09g、0.08g、0.07g、0.06g、0.05g、0.04g、0.03g、0.02g、0.01g、0.009g、0.008g、0.007g、0.006g、0.005g、0.004g、0.003g、0.002g、0.001g、0.0009g、0.0008g、0.0007g、0.0006g、0.0005g、0.0004g、0.0003g、0.0002g或0.0001g。

[0395] 在一些实施例中,本发明的医药组合物中所提供的TIL的量超过0.0001g、0.0002g、0.0003g、0.0004g、0.0005g、0.0006g、0.0007g、0.0008g、0.0009g、0.001g、0.0015g、0.002g、0.0025g、0.003g、0.0035g、0.004g、0.0045g、0.005g、0.0055g、0.006g、0.0065g、0.007g、0.0075g、0.008g、0.0085g、0.009g、0.0095g、0.01g、0.015g、0.02g、0.025g、0.03g、0.035g、0.04g、0.045g、0.05g、0.055g、0.06g、0.065g、0.07g、0.075g、0.08g、0.085g、0.09g、0.095g、0.1g、0.15g、0.2g、0.25g、0.3g、0.35g、0.4g、0.45g、0.5g、0.55g、0.6g、0.65g、0.7g、0.75g、0.8g、0.85g、0.9g、0.95g、1g、1.5g、2g、2.5g、3g、3.5g、4g、4.5g、5g、5.5g、6g、6.5g、7g、7.5g、8g、8.5g、9g、9.5g或10g。

[0396] 本发明的医药组合物中所提供的TIL在广泛剂量范围内有效。准确剂量将视施用途径、化合物施用形式、待治疗对象的性别及年龄、待治疗对象的体重及主治医师的偏好及经验而定。适当时亦可使用TIL的临床确定剂量。使用本文的方法施用的医药组合物的量(例如TIL的剂量)将取决于所治疗的人类或哺乳动物、病症或病状的严重程度、施用速率、活性医药成分的配置及开处方医师的判断。

[0397] 在一些实施例中,TIL可以单次剂量施用。此类施用可通过注射,例如静脉内注射。在一些实施例中,TIL可以多剂量施用。给药可为每年一次、两次、三次、四次、五次、六次或超过六次。给药可为每月一次、每两周一次、一周一次或每隔一天一次。TIL的施用可视需要持续。

[0398] 在一些实施例中,TIL的有效剂量为约 1×10^6 、 2×10^6 、 3×10^6 、 4×10^6 、 5×10^6 、 6×10^6 、 7×10^6 、 8×10^6 、 9×10^6 、 1×10^7 、 2×10^7 、 3×10^7 、 4×10^7 、 5×10^7 、 6×10^7 、 7×10^7 、 8×10^7 、 9×10^7 、 1×10^8 、 2×10^8 、 3×10^8 、 4×10^8 、 5×10^8 、 6×10^8 、 7×10^8 、 8×10^8 、 9×10^8 、 1×10^9 、 2×10^9 、 3×10^9 、 4×10^9 、 5×10^9 、 6×10^9 、 7×10^9 、 8×10^9 、 9×10^9 、 1×10^{10} 、 2×10^{10} 、 3×10^{10} 、 4×10^{10} 、 5×10^{10} 、 6×10^{10} 、 7×10^{10} 、 8×10^{10} 、 9×10^{10} 、 1×10^{11} 、 2×10^{11} 、 3×10^{11} 、 4×10^{11} 、 5×10^{11} 、 6×10^{11} 、 7×10^{11} 、 8×10^{11} 、 9×10^{11} 、 1×10^{12} 、 2×10^{12} 、 3×10^{12} 、 4×10^{12} 、 5×10^{12} 、 6×10^{12} 、 7×10^{12} 、 8×10^{12} 、 9×10^{12} 、 1×10^{13} 、 2×10^{13} 、 3×10^{13} 、 4×10^{13} 、 5×10^{13} 、 6×10^{13} 、 7×10^{13} 、 8×10^{13} 及 9×10^{13} 。在一些实施例中,TIL的有效剂量在以下范围内: 1×10^6 至 5×10^6 、 5×10^6 至 $1 \times$

10^7 、 1×10^7 至 5×10^7 、 5×10^7 至 1×10^8 、 1×10^8 至 5×10^8 、 5×10^8 至 1×10^9 、 1×10^9 至 5×10^9 、 5×10^9 至 1×10^{10} 、 1×10^{10} 至 5×10^{10} 、 5×10^{10} 至 1×10^{11} 、 5×10^{11} 至 1×10^{12} 、 1×10^{12} 至 5×10^{12} 及 5×10^{12} 至 1×10^{13} 。

[0399] 在一些实施例中,TIL的有效剂量在以下范围内:约0.01mg/kg至约4.3mg/kg、约0.15mg/kg至约3.6mg/kg、约0.3mg/kg至约3.2mg/kg、约0.35mg/kg至约2.85mg/kg、约0.15mg/kg至约2.85mg/kg、约0.3mg/kg至约2.15mg/kg、约0.45mg/kg至约1.7mg/kg、约0.15mg/kg至约1.3mg/kg、约0.3mg/kg至约1.15mg/kg、约0.45mg/kg至约1mg/kg、约0.55mg/kg至约0.85mg/kg、约0.65mg/kg至约0.8mg/kg、约0.7mg/kg至约0.75mg/kg、约0.7mg/kg至约2.15mg/kg、约0.85mg/kg至约2mg/kg、约1mg/kg至约1.85mg/kg、约1.15mg/kg至约1.7mg/kg、约1.3mg/kg至约1.6mg/kg、约1.35mg/kg至约1.5mg/kg、约2.15mg/kg至约3.6mg/kg、约2.3mg/kg至约3.4mg/kg、约2.4mg/kg至约3.3mg/kg、约2.6mg/kg至约3.15mg/kg、约2.7mg/kg至约3mg/kg、约2.8mg/kg至约3mg/kg或约2.85mg/kg至约2.95mg/kg。

[0400] 在一些实施例中,TIL的有效剂量在以下范围内:约1mg至约500mg、约10mg至约300mg、约20mg至约250mg、约25mg至约200mg、约1mg至约50mg、约5mg至约45mg、约10mg至约40mg、约15mg至约35mg、约20mg至约30mg、约23mg至约28mg、约50mg至约150mg、约60mg至约140mg、约70mg至约130mg、约80mg至约120mg、约90mg至约110mg,或约95mg至约105mg、约98mg至约102mg、约150mg至约250mg、约160mg至约240mg、约170mg至约230mg、约180mg至约220mg、约190mg至约210mg、约195mg至约205mg,或约198至约207mg。

[0401] 有效量的TIL可以通过具有相似效用的药剂的任何可接受的给药模式以单剂量或多剂量给药,包括鼻内及透皮途径、通过动脉内注射、静脉内、腹膜内、肠胃外、肌肉内、皮下、局部、通过移植或通过吸入。

[0402] 本发明还包括适用于使用本发明的TIL(尤其是UTIL)进行诊断及预后分析的试剂盒。本发明的试剂盒包括缓冲剂、细胞因子、瓶、培养基、产品容器、试剂及说明书。

[0403] 下文呈现了一个非限制性的多步骤实施方案,以建立TIL从肿瘤中的生长、建立快速扩张过程、确认辐照的PBMC饲养层没有扩张以及将静态培养物转移到WAVE生物反应器(参见例如<https://www.gelifesciences.com/en/us/shop/cell-culture-and-fermentation/rocking-bioreactors/consumables-and-accessories/single-use-readytoprocess-wave-cellbag-bioreactors-p-00346#overview>)以及调配及填充。

[0404] 在步骤一(第0天)中,冷藏保存的经解聚的肿瘤组织解冻且1:9再悬浮于补充有10%FBS及3000IU/mL的IL-2的T细胞培养基中,随后经由管线100至270 μ m过滤器过滤且在50mL离心管中离心,随后再悬浮于20mL中。获取样品用于流式细胞术分析SOP-以定量多种HLA-A、B、C及CD58⁺以及DRAQ7⁻细胞。

[0405] 在步骤二中,细胞悬浮液随后在细胞培养容器中以 $\geq 0.25 \times 10^6$ 至 $\leq 0.75 \times 10^6$ 个HLA-A、B、C及CD58⁺及DRAQ7⁻细胞/毫升在补充有添加的抗细菌剂及抗真菌剂(两性霉素B及庆大霉素)及白介素-2(IL-2)1000IU/ml的CM-T(补充有10%胎牛血清的T细胞培养基)中接种。T细胞经2周时间段在CM-T中生长出来,自第5天,移除一半培养基且用补充有10%胎牛血清、两性霉素B及庆大霉素及IL-2的新鲜培养基CM-T替换。这在第5天与第10天之间每2/3天重复,以确保细胞维持在 $\leq 0.1 \times 10^6$ 至 2×10^6 个CD45⁺CD3⁺膜联蛋白-V^{ve}(Annexin-V^{ve})DRAQ7^{-ve}细胞/毫升。根据PH Eur 2.6.27对TIL培养物上清液进行的微生物检查测试(第5天

至第7天)证实无微生物生长。流式细胞术分析(第7天至第10天)定量CD45⁺CD3⁺膜联蛋白-V⁻及DRAQ7⁻细胞的浓度。

[0406] 在步骤三中,用Ficoll(密度1.078g/ml)从多个同种异体供体(健康献血来源的白血球层)分离 4×10^9 个经照射PBMC(25至50Gy)。流式细胞术分析定量CD45⁺膜联蛋白-V⁻及DRAQ7⁻细胞。对经照射的PBMC进行的微生物检查测试测定微生物生长。

[0407] 在步骤四中,定量可供用于开始快速扩增过程的TIL的量(第12天)。流式细胞术分析定量CD45⁺CD3⁺膜联蛋白-V⁻及DRAQ7⁻细胞。

[0408] 在步骤5中,在封闭静态细胞培养袋中制备饲养细胞(经照射ficoll分离的PBMC)及生长补充剂在3L的T细胞混合培养基中的培养混合物,其含有: ≥ 3 至 $\leq 5 \times 10^9$ 个经照射的PBMC-CD45⁺膜联蛋白-V⁻及DRAQ7⁻细胞、7-9%人类AB血清、2000至4000IU/mL的IL-2及20至40ng/ml的OKT-3抗体。

[0409] 在步骤6中,在添加TIL之前获取饲养细胞(经照射ficoll分离的PBMC)的培养混合物的代表性样品以用于对照瓶。

[0410] 在步骤7中,将TIL添加至REP培养物: ≥ 1 至 $\leq 20 \times 10^6$ 个肿瘤来源的TIL-CD45⁺CD3⁺膜联蛋白-V⁻及DRAQ7⁻细胞。

[0411] 在步骤8中,静态培养物在干燥培育器中,在3.5%至6%二氧化碳及35℃至38.5℃下培育6天。在第14天和第18天,在含有不含TIL的REP混合物的对照烧瓶(在步骤6收集)中评估CD45⁺膜联蛋白-V⁻及DRAQ7⁻细胞的数目及存活率,以确保经照射的饲养细胞未扩增。

[0412] 在步骤9中,WAVE生物反应器袋在35至38.5℃与3.5%至6%二氧化碳下,与1.7L TCM预调节1至2小时,所述TCM补充有7至9%人类AB血清及2000至4000IU/mL的IL-2。

[0413] 在步骤10中,在WAVE生物反应器系统中转移及扩增TIL。

[0414] 在步骤11中,连接补充有2000至4000IU/mL的IL-2的灌注进料1×TCM 10L袋。

[0415] 在步骤12(第19至22天)中,调整第19天与第22天之间的灌注速率。

[0416] 在步骤13(第24天)中,停止灌注,且断开废料与进料。

[0417] 在步骤14中,浓缩且洗涤TIL。

[0418] 在步骤15中,在总体积范围为125至270mL的输注袋中,用悬浮于含有10%DMSO及8.5%HSA的PBS中的细胞制得最终药物制剂。

[0419] 在步骤16中,获取含有TIL的最终产物袋的样品用于QC分析及留样。新鲜药品的QC分析包括微生物检查测试及颜色及可见粒子测试。制备保留样品用于细胞剂量、存活率表型及效能;微生物检查及内毒素分析。

[0420] 在步骤17中,最终产物容器经标记且与最终产物标记重叠。

[0421] 在步骤18中,通过以-1℃/分钟至-60℃的受控速率冷冻来冷藏保存,以及转移至 $\leq -130^\circ\text{C}$ 储存。冷藏保存的药品的QC分析包括qPCR支原体测试、T细胞剂量及存活率测试、内毒素测试(如使用动力学显色LAL测试所测量的),以及效能测试,该效能测试评估在与表达抗CD3片段的细胞系共培养之后针对CD137⁺、IFN- γ ⁺、TNF α ⁺或CD107a⁺的组合的CD2⁺表达CD45⁺DRAQ7⁻。

表 1-仅使用静态培养袋的制造概述

CTU-TIL 编号 (性别)	来自第一扩增的 肿瘤来源 TIL ($\times 10^7$)	第二扩增中的 活 CD3+细胞 ($\times 10^7$)	扩增 倍数*	最终组织活 CD3+ ($\times 10^{10}$)
1 (F)	2.1	1.5	690	1.0
3 (M)	3.8	2.0	1100	2.2
5 (M)	8.2	1.5	1281	2.0
平均值 $\pm$ SD	6.0 $\pm$ 2.2	1.7 $\pm$ 0.23	1023 $\pm$ 303	1.7 $\pm$ 0.52
*-等于最终制造的 TIL/REP 中所用的 TIL				

表 2- 使用灌注生物反应器的制造概述

CTU-TIL 编号 (性别)	来自第一扩增的 肿瘤来源 TIL ($\times 10^7$)	第二扩增的活 CD3+细胞 ($\times 10^7$)	扩增 倍数*	最终组织活 CD3+ ($\times 10^{10}$)
12 (F)	5.4	2.0	1600	3.2
13 (M)	14.0	2.0	1010	2.02
14 (M)	5.8	2.0	2100	4.2
15 (M)	5.1	2.0	3100	6.2
16 (M)	3.0	1.8	3000	5.4
19 (M)	7.6	2.0	3400	6.8
20 (M)	1.4	1.1	5409	5.95
21 (F)	1.4	1.4	3646	4.85
27 (M)	5.1	2.0	1845	3.69
28 (F)	8.9	2.0	1590	3.18
32 (F)	34.0	2.0	1835	3.67
32 (F)	N/A **	2.0	1985	3.97
35 (M)	8.6	2.0	3125	6.25
36 (M)	3.2	1.6	2050	3.28

37 (F)	4.0	2.0	1265	2.53
38 (M)	0.55	0.32	3969	1.27
39 (M)	0.83	0.83	1398	1.16
40 (F)	1.4	0.71	7444	5.3
41 (M)	9.0	2.0	1555	3.11
42 (M)	9.8	2.0	1965	3.93
43 (F)	25.0	2.0	2310	4.62
47 (F)	2.67	2.0	1450	2.9
48 (F)	2.73	2.0	1865	3.73
51 (M)	4.1	2.0	1780	3.56
54 (M)	27.5	2.0	395	7.9
57 (M)	2.3	1.5	764	1.13
60 (F)	3.1	1.1	1486	1.56
63 (M)	0.84	0.89	5842	5.24
64 (M)	0.72	0.72	2993	2.14
67 (M)	0.38	0.37	7526	2.82
平均值±SD	6.61±8.2	1.56±0.61	2650±1770	3.52±1.69
*-等于最终制造的 TIL/REP 中所用的 TIL				
**-使用原始肿瘤来源 TIL 治疗两次的患者				

[0422] 本发明提供一种解聚系统或装置。在一些实施例中，解聚装置呈将组织解聚成单独细胞或细胞团块的踩踏装置的形式。在一些实施例中，解聚装置在解聚过程期间提供热控制。在一些实施例中，本发明提供一种冷藏保存系统或装置。在一些实施例中，提供一种用于解聚及冷藏保存及热控制的装置。在另一方面，本发明提供一个或多个柔性容器或含有复数个容器的系统，这些容器包含一个或多个适于用于在本发明的解聚/冷藏保存系统或装置中解聚、冷藏保存或解聚保存及冷藏两者的柔性容器。在一些实施例中，一个或多个容器或复数个容器互相连接且适于在封闭系统中使用。上述方面在本文所附权利要求中表示。鉴于下文提供的本发明示例的详细描述，本发明的更多优点和益处对于本领域技术人员将变得显而易见。

[0423] 在某些实施例中，解聚器包含一个或多个可移动表面，例如板和/或桨叶，且经设计以将压缩力及剪切力施加至组织样品。在一个实施例中，消化器包含能够相对于彼此移动的第一表面及第二表面。在某些实施例中，表面为经安置以向样品施加压力的相对表面。在一个实施例中，至少一个所述的表面在垂直于表面方向的方向上移动，以便施加压力至样品。在一个实施例中，表面经平行对齐且经设计以重复或循环方式移动到一起和分开，使得样品以循环方式于表面之间被重复地压缩随后松弛。在本发明的实施例中，样品的压缩及松弛在样品中产生剪切力。

[0424] 在一个实施例中,第一及第二表面中之一在另一表面移动时保持静止。在另一个实施例中,第一及第二表面皆移动。在一个实施例中,组织样品含于柔性和/或弹性容器中,其含有组织样品及可选的解聚流体或溶液。在某些实施例中,容器适应第一及第二表面之间随着表面移动体积的变化。在某些实施例中,容器为弹性的且将组织样品及解聚流体限制在相对表面的范围内。在某些实施例中,容器为柔性的且周围气压帮助将组织样品及解聚流体限制在相对表面的范围内。在某些实施例中,气压为环境压力。在某些实施例中,在封闭腔室中施加气压且压力大于环境压力。

[0425] 在某些实施例中,解聚装置包含并排安置的两个或更多个相对表面组。在一些此类实施例中,该组共享一个表面(例如单个板,可选地保持静止),而各组的第二表面并排定位且向静止板施加压力。第二表面可交替地以踩踏运动施加压力。在某些此类实施例中,采用柔性容器,其限制组织样品及解聚流体在静止表面与移动表面之间的空间内,同时允许容器的内含物在移动表面之间来回流动。在某些实施例中,容器经调适以限制或防止内含物的这类来回移动。在一个实施例中,跨越容器的密封口阻断内含物从一侧至另一侧的流动。在另一个实施例中,跨越容器的挡板限制内含物从一侧至另一侧的流动。

[0426] 踩踏表面可通过任何合适的机制致动。在本文中作为装置100公开的是横向杆系统的示例,该横向杆系统被设计为使踩踏表面交替地抵着柔性容器移动。踩踏表面有弹簧,弹簧经设计以抵着容器按压踩踏表面,同时允许容器厚度的变化及容器中的粒度变化。在某些实施例中,弹簧为预负荷的。本文中公开为装置200的为致动设计的示例,该致动设计具有两个踩踏表面。在装置200中,预负载弹簧抵着柔性容器按压踩踏表面且凸轮机构循环地以远离柔性容器的方向升高一个踩踏表面,随后另一个。在另一个实施例中,一个或多个摇臂或杆用于提升踩踏表面远离容器。在又一个实施例中,踩踏表面以液压方式升高及降低。在又一个实施例中,踩踏表面以气动方式升高及降低。虽然在200装置中,存在交替地接触解聚容器的两个踩踏表面,但在某些实施例中,致动机构允许所有移动表面同时施加压力,包括当系统静止时。此类特征可用于在解聚过程结束时清空解聚容器的内含物。举例而言,代替位于中间位置或一个升高且一个降低的踩踏表面,所有踩踏表面均相对于解聚容器降低,通过连接的导管挤压出其内含物(可选地过滤)至二级接容器,例如冷藏保存容器中。

[0427] 在本文中示例的完全封闭的解聚及冷藏保存系统中,特征在于自动化解聚,随后人工过滤且通过注射器及管的密封系统转移至冷藏保存容器中且自动化冷藏保存。有利地,经解聚的肿瘤组织人工地从解聚容器转移至冷藏保存容器,而解聚及冷藏保存步骤通过经程序化以依序管理两个步骤的同一自动化装置进行。在其他实施例中,解聚程序经设计以使得在终止时,经解聚的肿瘤组织从解聚容器自动移动至冷藏保存容器。在某些实施例中,与连接管接触的蠕动泵及阀控制内含物的流动。在某些实施例中,解聚器的踩踏表面被安置为以将经解聚的肿瘤溶液可选地通过过滤器从解聚容器推送或挤压至冷藏保存容器中,阀控制内含物的流动。在此类实施例中,如本文所例示,优选通过相同装置控制及进行封闭系统中的解聚及冷藏保存以及材料的任何转移。

[0428] 已针对包括力、消化时间及速度(RPM或循环/分钟)的变量来测试及优化若干解聚系统。针对力、时间及速度变量的组合确定了使用多种组织类型的结果及预测,包括至多及高于60N的力、至多及高于60分钟的消化时间及至多及高于240RPM的速度。在本发明的某些

实施例中,力为20-200N,或30-120N,或30-90N,或40-60N,或10-20N,或20-30N,或30-40N,或40-50N,或40-45N,或45-50N,或50-55N,或55-60N,或60-65N,或65-70N,或70-75N,或75-80N。典型踩踏脚具有约20至50cm²的面积。基于30cm²踩踏表面,踩踏压力为0.5-6.5N/cm²,或1-4N/cm²,或1-3N/cm²,或1-2N/cm²,或1.5-2.5N/cm²,或2-3N/cm²,或2.5-3.5N/cm²,或1.5N/cm²±0.5N/cm²,或2N/cm²±0.5N/cm²,或2.5N/cm²±0.5N/cm²,或3N/cm²±0.5N/cm²,或4N/cm²±0.5N/cm²,或5N/cm²±0.5N/cm²。标称压力可使用压力传感器量测,优选地针对解聚容器的厚度校正。在某些实施例中,解聚装置并入压力传感器。在本发明的某些实施例中,消化时间为90分钟或更短,或75分钟或更短,或60分钟或更短,或50分钟或更短,或5-120分钟,或15-100分钟,或30-90分钟,或40-60分钟,或5-10分钟,或10-20分钟,或20-30分钟,或30-40分钟,或40-45分钟,或45-50分钟,或50-60分钟,或60-65分钟,或65-70分钟,或40分钟±5分钟,或45分钟±5分钟,或50分钟±5分钟,或55分钟±5分钟,或60分钟±5分钟,或65分钟±5分钟,或70分钟±5分钟。在某些实施例中,解聚装置在60-360RPM,或120-340RPM,或180-300RPM,或210-270RPM,80-160RPM,或120-200RPM,或160-240RPM,或200-280RPM,或240-320RPM,或280-360RPM,或60RPM±20RPM,或80RPM±20RPM,或100RPM±20RPM,或120RPM±20RPM,或140RPM±20RPM,或160RPM±20RPM,或180RPM±20RPM,或200RPM±20RPM,或220RPM±20RPM,或240RPM±20RPM,或260RPM±20RPM,或280RPM±20RPM,或300RPM±20RPM,或320RPM±20RPM,或340RPM±20RPM,或360RPM±20RPM下操作。

[0429] 在某些实施例中,物理解聚是连续的。在某些实施例中,物理解聚是周期性或间歇性的。举例而言,当在解聚样品中观测到温度提高时,可能有利的是短暂减缓或中断物理解聚以降低或防止温度提高或允许温度平衡至设定点。不希望受理论约束,温度提高可通过解聚装置物理操纵样品、来自装置的活动踩踏机构的热传递、在解聚过程活动时从样品到冷冻单元的减少的物理接触或热传递或其他原因发生。在某些实施例中,周期性或间歇性解聚可有益于解聚装置。在如本文中所公开的凸轮驱动装置中,凸轮机构的预期寿命可通过周期性地将凸轮旋转方向不时逆转,从而通过在凸轮的两侧上分布磨损而延长凸轮的寿命而提高。在本发明的实施例中,物理解聚的活动时间段包括但不限于15至30秒、20至40秒、30至60秒、45至75秒、60至90秒、至少20秒、至少30秒、至少40秒、至少1分钟、至少1.5分钟或至少2分钟。不活动的持续时间可为但不限于1秒至10秒、10秒至20秒、20秒至30秒、30秒至40秒、40秒至60秒、5秒、10秒、20秒、30秒、40秒、60秒、90秒、120秒或之间的持续时间。不活动的持续时间可与解聚装置逆转方向所必需的时间一样短。

[0430] 在一些实施例中,表面为经安置以相对于彼此横向移动的相对表面。在某些此类实施例中,横向运动包含线性横向运动。在某些此类实施例中,横向运动包含轨道横向运动。在某一个实施例中,存在线性及轨道横向运动两者。

[0431] 在一个实施例中,相对表面为平的。在一个实施例中,至少一个所述表面中包含凸面区,并已经安置以相对于另一表面以摇摆运动移动。凸表面及摇摆运动的一个方面为提供蠕动样动作。

[0432] 根据本发明,表面的移动受控,此类控制包含控制表面移动的一个或多个方面,包括但不限于速度、样品压缩、系统压力、持续时间及循环频率。在某些实施例中,板移动的一个或多个方面为恒定的。在某些实施例中,板移动的一个或多个方面取决于解聚的状态。在某些实施例中,解聚的状态通过解聚程序的时间定义,例如一个或多个预定义阶段,例如以

小时、分钟及秒为单位量测的早期、中期、晚期或更精确时间段。在某些实施例中，解聚的状态系由肿瘤块的小分布定义。举例而言，在本发明的一个实施例中，随着肿瘤块的大小减小，压力增加。

[0433] 解聚装置及替代方案的实施例

[0434] 参照图41，显示了用于在封闭的且至少最初无菌的、通常为平坦侧面且相对薄的样品容器袋10内将组织分解成单独的细胞或细胞团块的踩踏装置100。装置包括由部件组装形成的外壳110，所述部件可以可移除方式插入至温控装置，诸如受控温度速率变化冷冻器、解冻器或加温器，例如称为Via Freeze™的市售冷冻器，或提供受控速率的温度变化的任何其他装置，示意性地展示于图41中且本文中一般描述为冷冻器40。在实践中，外壳将包括未示出的盖子。在使用中装置及袋提供封闭系统以解聚组织（例如切除的肿瘤、部分的切除的肿瘤或穿刺活检等），且随后冷藏保存所得细胞悬浮液以供后续分析，而无需将解聚的样品从袋10中转移出来。

[0435] 外壳110具有底盘112，该底盘112连接有包括电马达及变速箱的马达单元114，其具有10至300rpm的输出速度。马达及变速箱114的输出轴具有驱动连接杆118的曲柄116，该连接杆转可枢转地连接至踩踏机构120，曲柄116每转一圈，踩踏机构120将移动一个踩踏循环，即0.2与6秒之间的踩踏循环。更详细而言，此踩踏机构具有平行四边形四杆联动装置，其包括刚性地安装至底盘112的两个间隔开的枢轴122及124，其分别可枢转地安装两个相对平行水平杆126及128。每个所述水平杆具有两个平行踩踏杆130及132，其在枢轴122及124的每一侧上可枢转地连接至其上，一起形成平行四边形连杆。连接杆118方便地可枢转地固持至顶部水平杆的延伸部，使得该延伸部的移动引起踩踏杆130及132的循环上下运动（在所展示的方向上）。各踩踏杆130及132连接有脚组件134及136，通过上述循环运动，脚组件134及136将随曲柄116的运动依次向上及向下移动，即：当一个脚向上时另一者将向下，且反之亦然。

[0436] 脚组件134及136各自包括平面底板138及140，各板通过螺旋金属弹簧146分别被弹簧安装至上部脚框架142及144。在上文所描述的配置或等效配置（若使用）中，弹簧146是预负荷的。在此情况下，对于各脚，组合的预负荷优选为40至80N，更优选为30至70N，优选为约60N。组合的弹性系数（spring rate）为每毫米1N至5N，优选为每毫米约3N，且预期脚移动为约8mm至12mm，优选地为约10mm。另外，各脚的表面积意欲为约20至50cm²，优选约35cm²。这导致袋上的假想压力在零之间（当脚抬离袋或实质上空载，且高达约6N/cm²（约9psi）。优选假想压力为约2N/cm²（约3psi）。然而，考虑到袋子至少在踏步过程开始时可能不包含均质材料，则将存在材料块，所施加的力将集中于该材料块，且因此压力被描述为“假象的”，其为理想情况，例如踩踏过程即将结束时提供所施加于袋10的最小压力阻力。

[0437] 在底盘的底部为柔性袋10的接收区域148且相邻接收区域148的是传热板150。区域148足够大以准许样品处理袋10可经底盘的前部滑动至板150上（前部展示于图41中）。板包括袋10位于其上的上表面151，及在使用中暴露以供外部影响的加热或冷却的下表面152。上表面151大体平行于各脚的底板138及140，使得底板大体平行于表面151移动。换言之，平底板在大体上垂直于表面151的方向上移动，其防止机构120上的显著侧向力。板150由金属形成，所述金属优选为铝或铜或金或银或含有那些金属的合金。热导性优选高于100且更优选高于200W/m K（在20℃下测量）。板150材料的厚度为约3mm或更小，且提供低热质

量,且因此提供随着板的相对侧上的温度变化的袋10的内含物的更快速反应。

[0438] 另外参照图42及43,通过供应电流至马达单元114,以在此实施例中如通过箭头C所示顺时针驱动曲柄116来操作装置。曲柄使连接杆118操作上述踩踏机构120。应注意,曲柄的冲程的顶部及底部(在此将最大力施加至机构120)与各脚组件134及136的最低位置一致。脚组件在箭头U及D的方向上上下移动以依次按摩样品袋10,使得袋10的内含物有机会移动至远离相应的踩踏脚的一侧。由于袋中潜在的固体的组织样品可从踩踏脚上移开,且因为各脚的底板138及140经弹簧负载,即使当其处于其冲程底部时,也向脚提供额外的弹性移动,故当希望解聚较大组织质量时,机构会卡住的可能性较小。依序踩踏动作也降低袋10破裂的几率。

[0439] 图44为上文所描述的装置100的平面视图,但在此视图中,袋10未就位。尤其地,可看到脚组件134及136的相对并排位置,其相间隔,并且在平面图中具有一个共同的区域,其面积约等于当平坦铺设时袋10的面积,但袋10的面积的大约正负10%的面积差异具有实用性。

[0440] 图45示出了装置100'的另一平面视图,其在构造上类似于上文所描述的装置100,但在此替代方案中,马达单元114的马达113通过使用90度变速器115横向于其变速器115的输出轴配置,使得马达113并不突出超出装置100'的背壁111。因此,必要时,此装置100'可适配于较小冷冻器体积中。

[0441] 在上述解聚处理期间,通过脚组件134及136施加的力通过传热板150反应。此意味着在处理期间将样品袋10压在板150的接触表面151上,提供样品袋10与板表面151之间的良好表面接触,且因此改良热能传递。

[0442] 图46、47及48示出了上文所提及的柔性样品袋10的不同实施例。将使用中的袋滑动至装置100或100'中的接收区域148中的适当位置,并搁置在所提及的两个脚134及136的下方。因此,该袋具有约高达12mm厚度的一般扁平构造,且具有一些额外的柔顺性以便使组织样品适配于其中。如自图46可见,示出了袋10的一种构造,其由仅在其周边14处密封以形成中心腔体12的两层塑料材料及用于进入腔体12的端口16形成。袋可由EVA形成。在使用中,优选地,端口16或其中的至少一个足够大(即直径为约10mm或更大),以接受在必要时已切碎成小块且通过注射器传递至袋腔体12中的样品。然而,也有可能在与端口相对的袋的末端包括所谓的“拉链锁(zip-lock)”出入口,使得可将大的组织样品放入袋中且随后重新密封袋。“拉链锁”可一次或多次折叠以形成接缝,于弹性通道内部或借助于另一夹具或多个夹具(未图示)保持折叠以减小泄漏的机率。作为替代方案,袋10可打开且可添加组织。袋随后可经热密封,其中其内含物在适当位置。袋10包括用于在使用中将袋定位在装置中且在踩踏期间将袋固持在适当位置的角孔18。尽管图展示了具有一个腔体12的袋10,但将有可能提供具有超过一个腔体的袋,例如两个、三个、四个或五个腔体,例如复数个腔体中的每一个为细长的且具有最初开放的、可热密封的末端,及在其另一端可密封的端口,其用于引入例如解聚酶的试剂,且用于在解聚完成或基本上完成后取出解聚样品。

[0443] 图47示出图46的袋10,其通过框架上的栓钉24安装于定位框架20中,这些栓钉24装配至角孔18中。框架20为将袋10定位及保持在装置100/100'内的适当位置的替代方式。框架20包括定位孔22,其与装置协作以用于在踩踏期间将袋定位且保持在适当位置。框架具有内部开放窗26,其具有光滑的圆化内部边缘23,以在使用中容纳腔体12及踩踏脚134及

136. 框架20使得将袋10装载至装置100/100'及自装置100/100'卸除更容易。

[0444] 图48示出替代性框架20', 其具有各自类似于框架20的构造的两个大体上对称的半部。各框架半部另外具有柔性壳30, 其模制至框架20', 使得两个半部如蚌蛤壳合于一起, 包围袋10。若袋10在使用中内部断裂, 则顶部及底部柔性壳充当防护壁 (bund)。此特征尤其适用于感染性组织样品。

[0445] 在又一替代方案(未图示)中, 可采用简单的袋于袋内 (bag-in-bag) 配置以容纳泄漏。在又一替代方案中, 袋可包括具有弹性(至少在室温下)的独立孔的基底, 使得可例如在如下文所描述的冷冻之后, 在不使用整个样品的情况下移出样品的等分试样。或者, 可密封袋可进一步热密封成多个部分, 以允许样品分离。

[0446] 置入袋10的样品的处理在一个实施例中可主要遵循W02018/130845中所描述的步骤。在此配置中, 包含组织的密封袋T0悬浮在水溶液中, 其可含有消化酶(诸如胶原蛋白酶及蛋白酶)以促进组织分解, 通过端口16引入至袋中。此处将袋置放于板150上且通过例如外部热源升温至大约35°C以促进组织消化速率。此处提出的一个重要差异为采用单个样品处理袋, 且消化酶可在解聚之前或期间通过袋中的端口16之一引入。传热板150可用于通过在其底面加热板来将热能引入至袋中, 以在用于酶作用的袋中提供所期望的温度。该热量可方便地来自电加热升温板, 或板150中或上的电加热组件。解聚作用的量将视许多参数而定, 例如初始组织样品的大小、密度及弹性, 且因此解聚的时间及踩踏的速率将显著变化。过长或过度剧烈的踩踏可引起细胞存活率降低。因此, 马达单元速度及解聚时间段是重要的。解决此问题的一个选项为根据包括解聚类似样品所需的时间及输出速度的查找表控制处理时间。另一选项为测量随时间推移进行解聚处理所需的瞬时电功率或电能, 或量测施加于板150或机构的另一部分上的力或应力, 且在已达到预定阈值之后停止, 以指示样品已充分解聚。随着功率/力/应力减小, 解聚更接近于完成。另一选项为测量通过袋的吸光度-吸光度愈大, 样品愈接近完全解聚。在解聚完成之后, 可转移袋内含物, 且可分离细胞或其他相关组分且将其置回新鲜袋中, 以供在装置100/100'中冷冻。或者, 且优选地, 全部解聚材料可留在袋及用于冷冻的装置中。冷藏保护剂通过端口16引入袋中。

[0447] 本发明的方法与W02018/130845中所述的方法之间的另一差异为在引入冷藏保护剂后, 将袋中具有解聚样品及冷藏保护剂的装置安装(或保持)于装置, 且整个装置安装于如上文所描述的冷冻器40中。冷冻器的基底是冷的, 且因此经传热板150从袋10吸取热能。为了控制冰形成且防止样品在袋冷却时过冷, 其可以上述方式由脚134及136按摩(尽管速率比解聚要慢), 以控制冰成核且因此增加解冻之后的细胞存活率。电能可经由导线导体供应至马达单元114, 以维持机构120在冷冻器(例如冷冻器40)(图41)内部的运动。

[0448] 由于装置可从冷冻器移除, 因此在使用之后进行清洁更容易。

[0449] 当需要使用时, 袋10中的冷冻解聚样品可通过进一步的外部加热板150和/或通过将装置100/100'部分浸没于温暖水浴中, 保持在约37°C下且移除冷藏保护剂而快速在装置100/100'中解冻。在各个情况下, 可在解冻期间按摩袋。若酶仍存在, 则其也可在需要时例如通过过滤移除。一般而言, 其在冷藏保存期间将对细胞具有极小影响或对细胞无影响, 因为其在低温下暂停作用。样品的所有过程操纵、升温、解聚、冷却、冷冻及随后解冻在相同的密封柔性袋10中发生, 且可在单个装置中进行。这不仅是时间及空间高效的, 而且其使得单一纪录能够捕捉在处理期间样品发生的所有事物, 例如温度、持续时间、解聚速度、冷冻方

案,且减少误差的机率,诸如样品在处理机之间的不受控环境中度过过多时间。

[0450] 用于组织样品处理及冷冻的设备及技术的更特定实施例在下文给出。

[0451] 图49示出了由例如EVA或PVG膜的热塑性材料形成且具有用于接受组织样品T的开口11的袋10的实施例。袋包括连接至一个或多个端口16的导管13(图46),该导管包括一个或多个分流器17、压缩阀19及标准Luer型连接器15。所展示的单一导管线仅为说明性的——袋10可包括经复数个端口16连接的额外的平行导管。

[0452] 一旦组织T在袋10内部。开口11可通过以下密封:在图50中展示为封闭及密封,且在同一图中以点划线展示为开放的机械夹持密封口9,和/或通过使用如图51A中所示的热密封机器50进行热密封以产生一个或多个热密封封闭条带(例如复数个平行条带)8,各方法形成密封腔体12(图46、47及49)。

[0453] 用于密封袋10的替代或额外方式示于图51b及51c中。如图51c中所示,在密封口8处热密封之后,袋10可夹持于两部分夹具60中,其包含由一对螺钉66迫使在一起的顶部杆62及底部杆64。图51b示出了处于分解状态的夹具60,但在使用中,螺钉66在插入袋10之前不必从剩余的夹具中完全移除。顶部杆62具有锥形凹槽68,其中在夹持时具有互补楔形形成物61。凹槽及楔在楔的顶点65处集中夹持力,在顶点处提供比平夹持面可达成的夹持力更高的夹持力。为了甚至更多夹持力,顶点65在其峰处具有小通道67,该小通道67在使用中在顶部杆中被互补脊形形成物69相接。在某些实施例中,力足以抵消对热密封口8的需求。在某些实施例中,需要热密封口或其他袋密封机构,例如以提供在解聚器外操作含样品的袋。在某些实施例中,夹持装置确保密封口的完整性。夹持力通过不容易弯曲的顶部及底部杆的厚度及刚度进一步增强,且因此维持由螺钉66施加的夹持力。图51c示出了处于夹持状态下的夹具60。突起63与踩踏装置100/100'或200(如下文所描述)的特征相接以阻止在踩踏期间夹具的移动,且进而阻止夹持袋10的移动。夹具60的外部周边及高度具有经设定的大小及形状以适配于样品接收区域148(或248,图62及以下)的互补部分中,且因此在踩踏期间提供夹持袋10的进一步定位。尽管未说明,但夹具60也可并入如图47及48中所展示的额外框架20、20',且使得夹具刚性地安装至框架的一个末端,且一个或多个端口16(图46及49)支撑于框架的另一末端处。

[0454] 参考图52,在使用中,一旦密封,可通过导管13将消化酶E引入至腔体12中,例如通过使用连接至分流连接件17的注射器5将酶注入至袋中。通过将袋子保持直立,空气可随后通过抽出注射器5的活塞而从腔体12移除,如图53中所示。可手动进行酶E及组织T的初始混合,如图54中所示。

[0455] 随后可开始将袋10装载至踩踏装置100中以解聚,无论有或没有框架20/20'及防护盖板30,如图55中所说明的。

[0456] 随后如上文所描述进行解聚过程。一旦完成(其可耗费若干分钟至若干小时,例如约10分钟至7小时,优选地40分钟至1小时),可例如使用上文所描述的袋装置及连接至分流器17的额外样品等分试样袋7(如图56中所示)将解聚的液化样品次分为等分试样。在那个情况下,使用注射器5以在箭头F方向上将液化样品抽取至袋10之外,打开阀19a及19b且关闭邻近样品等分试样袋7的阀19c。一旦足够样品已抽取至注射器5中,关闭阀19b,阀19a保持打开,且打开阀19c。注射器随后用以沿图57中的箭头F方向迫使液体进入样品等分试样袋7中。等分试样袋7的导管13可借助夹持热密封机55热密封且示于图58中。可重复该过程

直至获得足够等分试样或直至不再有样品留下。袋可已经部分地划分区域以使得密封分隔各区室更简单。

[0457] 如上文所描述,样品袋10可保持在踩踏装置100(图55)中且随后可将踩踏装置装载至受控速率温度改变装置(在此情况下为如图59中所示的冷冻器40中)。技术允许在冷冻期间继续踩踏以抑制冰晶体形成,但在实践中可在冷冻之前移除袋10,且冷冻器40随后仅在踩踏期间经由传热板冷却样品。在替代方案中,等分试样样品袋7可替代整个样品袋10。在另一替代方案中,冷冻器40可用于通过将踩踏装置100安装于冷冻器40的顶部,以将未经处理或经处理的样品平缓地冷却至约4℃,其中冷冻器盖子打开,从而使基底150冷却,如图60中所示。在另一替代方案中,有可能移除基底150且使其置于冷冻器中,其中冷冻器盖子盖好,如图61中所示。在又一替代方案(未展示)中,袋10或7可直接于冷冻器40中冷冻。

[0458] 本发明不应被视为受限于上述实施例,而是可以在所附权利要求的范围内变化,这对于本领域技术人员来说是显而易见的。举例而言,上文所描述的踩踏机构为优选的,因为其提供完全枢转机械互连,相比滑动表面,其在寒冷条件下卡住的可能性较低,但该机构可用任何用于两个或更多个脚依序踩踏的机械等效构件替换。所描述的平脚可用棍脚替换,其中踩踏运动为左右运动而非上下运动。所描述的踩踏或其机械等效运动的速率优选为各脚每秒2或3次踩踏,以优化解聚且使细胞回收率最大化,且为稳定踩踏,但对于不同细胞类型,踩踏可更快或更慢或为间歇性的。

[0459] 由于装置100/100'意欲置放于冷冻器中且经受极低温(例如,-80℃或更低),因此优选使用金属部件,尤其是如弹簧146的那些部件,这是因为聚合部件在低温下变得更加坚硬。另外,紧密适配部件(如活塞及筒)可在极低温下变得卡住或适配不良,因此如所描述的机构120的简单可枢转联动装置是优选的。

[0460] 图62、63及64展示替代性踩踏装置200,其大小及功能类似于上文所描述的装置100。装置200具有在下文更详细地描述的某些差异。

[0461] 参照图62,装置100与装置200之间的主要差异在于,装置200具有不同于装置100的机构120的踩踏机构220。两个踩踏脚234、236以类似于图42及43中所展示的运动的循环替代性踩踏运动由24伏特DC电马达213(图63)驱动,该马达213为电马达单元214的部件,该电马达单元214具有将回馈提供至控制器221(图63)以用于监测及控制踩踏运动的速度度的旋转编码器。马达经由齿形带222驱动凸轮轴224。凸轮轴包括以180度偏移的一对凸轮230、232,在此情况下,各自轮廓为摆线形状以提供凸轮从动件的简谐运动。各凸轮可操作以移动凸轮从动件组件,其包括骑在凸轮轮廓上的相关联的弹性从动轮225、227,以及与弹簧从动件托架226、228呈力传递关系的从动轮轴221、223。各托架226、228在线性引导件229中滑动,且各个脚234、236连接至托架。随着各个凸轮通过马达克服回动弹簧231的推力而旋转,当每个组件与脚一起骑着凸轮轮廓离开踩踏状态时,每个组件依次被相应的从动轮向上推动。当凸轮进一步旋转且凸轮轮廓后退时,与各从动件组件相关联的弹簧231用踩踏力迫使组件及脚朝下。

[0462] 藉此,踩踏力限于相关联的从动件组件弹簧231的弹性系数而非驱动马达的动力。
1. 施加至袋的力在使用中受到弹簧限制,这是因为机构驱动脚向上且弹簧将其向下推动回去。此确保:

[0463] a. 马达不会失速(不管肿瘤大小或质地如何);

[0464] b.样品不被过量的力压缩,且袋不会裂开;

[0465] c.施加至袋的最大压力低于袋制造期间测试的压力;及

[0466] d.如下文所描述,铰接袋接收区域248可接受样品袋及所使用的任何夹具,而不必预先定位脚。换言之,当接受袋时,脚可处于任何位置,这是因为铰接样品区域248抵着脚封闭,且若需要,由于铰接区域抵着脚封闭,任何样品可在此时由脚压缩。

[0467] 还参考图63及64,装置200进一步包括从装置外壳210延伸至两个脚234、236的上部部分的柔性密封膜241,其提供脚底与踩踏机构220的剩余部分之间的流体阻力及防尘密封。若压缩袋在使用中裂开,则该配置阻止机构污染。尽管膜241是优选的,但脚可以在密封件(例如安装到将机构220与袋区域248隔开的隔板上的唇形密封件)中滑动,并且在需要时实现类似的机构污染抑制。

[0468] 装置200进一步包括传热板250,该传热板执行与传热板150相同的功能。然而,该板250铰接至铰链255处的外壳的一侧(图64),使得待踩踏的袋的插入及移除(如图46、47及48中所展示)更容易。传热板250包括温度传感器256,其允许为了质量控制而由控制器监测及记录板250及袋接收区域248的温度。板250具有第一表面251及第二表面252,其具有与上文所描述的表面151及152相同的功能。

[0469] 各脚可调整相对于装置200的传热板250的高度,且其移动的指示也由控制器监测。因此,即使旋转编码器可指示马达正转动,但诸如齿形带222的故障的机械故障仍可由控制器探测,且可实施合适的动作,例如发出警报。

[0470] 装置200具有与装置100相同的外部尺寸,且装置的外壳210意欲在受控速率冷冻器40内部滑动,其中冷冻器盖盖好,如上文所描述且在图61中说明。

[0471] 为方便起见,例如上部、下部、上及下的术语及更描述性的术语,例如脚、踏及踩踏已用于描述图中所展示的发明,但在实践中,所展示的装置可以任何方式定向,使这些术语在该新方向上变得例如倒置或描述性降低。因此,关于定向的限制性不应通过此类术语或同义术语来解释。

[0472] 本发明提供用于在封闭柔性袋(10)中将组织样品解聚成单个细胞或细胞团块的装置(100/100'),该装置包括机械解聚机构(120)及组织样品袋接收区域(148),该装置进一步包括用于将热能转移至区域(148)或自该区域转移热能的传热板(150),板具有邻近区域(148)的第一板表面(151)及背离区域(148)的暴露于外部热影响的相对表面(152)。

[0473] 在收集时肿瘤组织的冷藏保存使得能够将制造与肿瘤收集分开。这意味着UTIL制造可作为从肿瘤消化物解冻直至最终TIL收集物洗涤、药品调配、填充、标记及冷藏保存的单一制造过程规划及进行。

[0474] 最终产物的冷藏保存使得待在调节化学疗法及患者治疗之前进行的所有放行测试(release testing)能够与最终产物制造位置分开。

[0475] 使用流式细胞术表征及定量制造的产物。TILd定义为表达细胞表面标记物CD3的T细胞,其已通过对起始材料的代表性样品进行病理学评估培养衍生自转移性肿瘤。存活率为基于不结合早期细胞死亡标记物膜联蛋白-V和/或存活率染料DRAQ7(等效于台盼蓝或PI)的所有CD3⁺细胞的百分比。纯度定义为活T细胞(CD3⁺、膜联蛋白-V^{-ve}及DRAQ7^{-ve}) 在活造血细胞群体(CD45⁺、膜联蛋白-V^{-ve}及DRAQ7^{-ve}) 内的百分比。

[0476] 在快速扩增方案(REP)之前绝大部分细胞为表达CD3的T细胞。在研究以及临床批

次中,观测到CD3+CD8+及CD3+CD4+TIL的不同分布且其将包含含有肿瘤反应性细胞的子集。由于TIL在REP中使用抗CD3扩增,因此最终产物几乎仅含有活CD3+T细胞(>94%)。

[0477] 从理论上讲,最终产物仍可能含有肿瘤细胞,尽管由于强烈且选择性地促进T细胞生长和T细胞介导的肿瘤细胞杀害的培养条件,这是非常不可能的。数百次TIL输注的临床数据通过细胞学未显示肿瘤细胞的存在。为了整理数据以最终设定规格,已并入测试以鉴别所有在原始IPC分析中非造血的活细胞材料且也将测试癌症生物标记的出现频率。

[0478] TIL细胞药品为在含有8.5%人类血清白蛋白及10%DMSO的大约125至270ml缓冲等渗生理盐水中的悬浮液。存在的细胞数目取决于培养物中待扩增的每个个体的TIL细胞的能力以及培养条件及制造可重复性。

表 3 - 示例性药品组成		
组分	数量 (每输液袋)	功能
肿瘤来源的 T 细胞	5×10^9 至 5×10^{10} 个 CD45 ⁺ 、CD3 ⁺ 、膜联蛋白-V ⁻ 、DRAQ7 ⁻ 细胞	活性
20%人类血清白蛋白	8.5% HSA W/V	吸收抑制剂
磷酸盐缓冲盐水	125 至 270 ml	等渗稀释剂
DMSO	10% V/V	冷藏保护剂

[0479] 参考图1,公开了装置的解聚模块。在涉及酶消化的实施例中,装置可包含用于解聚及消化的柔性容器1a。开口端1b准许将实体肿瘤组织材料转移至容器1a中。悬挂孔1c允许容器1a在运输或使用期间悬挂且被支撑。为了维持装置的无菌条件,目标热熔接位置1d使得容器1a可使用热熔接器13c或其他类似方式密封。容器1a可在容器1a的内表面上具有圆形边缘1e以减少损耗,损耗可作为转移至图2a-c或图3a或图3b中所说明的实施例的一部分出现。导管1f使得培养基3a能够通过无菌过滤器2a转移至容器1a中。无菌过滤器2a包含准许在后续模块中穿刺密封口以促进培养基3a的转移的长钉。导管1g使得能够经无菌过滤器2b将消化酶3b转移至容器1a中。无菌过滤器2b包含准许穿刺密封口以促进消化酶3b转移至容器1a中的长钉。在实体肿瘤组织解聚,尤其涉及酶消化之后,解聚混合物经包含无菌过滤器4b的过滤器单元4a转移离开导管1h,随后进入培育阶段。过滤器单元4a可为柔性的,以准许扭曲而不影响过滤过程的效用。过滤器4b移除未解聚组织。导管夹具5a允许培养基3a经无菌过滤器2a进入柔性容器1a。在涉及酶消化的实施例中,导管夹具5b允许酶3b经无菌过滤器2b进入柔性容器1a。导管夹具5c允许柔性容器1a的内含物经由过滤器单元4a进入图2a-c或图3A或图3b中识别的一个或多个实施例。

[0480] 根据图2a,无菌过滤器2c准许引入冷藏保存经解聚的肿瘤组织所需的培养基3a和/或冷冻溶液3c。过滤器4d可为细胞/组织凝集物的额外大小分离所需。过滤器4d围封于过滤器单元4c内,该过滤器单元可为柔性的,以准许扭曲而不影响过滤过程的效用。在一个实施例中,可能需要过滤器4e以保留细胞,但允许洗掉培养基及细胞片段。过滤器4d以类似方式围封于过滤器单元4c内。在一个实施例中,导管夹具5d在适当位置以阻止来自容器1a的、已穿过过滤器单元4a及4c的材料返回至容器1a。在一个实施例中,导管夹具5e在适当位置以允许来自容器1a的、已穿过过滤器单元4a、4c及4e的废料进入废料容器6a,但阻止培养

基3a或3c经无菌过滤器2c进入。在废料经导管夹具5e进入废料容器6a中之前,导管夹具5f阻止来自容器1a的、已穿过过滤器单元4a、4c及4e的材料返回至培养基3a或3c的来源或转移至图3a或图3b中所说明的实施例其中之一。一旦废料耗尽,导管夹具5e及5d闭合,且导管夹具5f允许培养基3a或3c将过滤器4e内的细胞转移至图3a或图3b中所说明的实施例其中之一。废料容器6a具有悬挂孔以在使用和/或运输期间支撑废料容器6a。

[0481] 图2b说明装置的富集模块。导管夹具5g允许容器1a的内含物通过过滤器单元4a进入富集模块的柔性容器7a。导管夹具5h允许容器7a的内含物穿过过滤器单元8a,保留及富集细胞,同时允许废料及碎片在富集细胞经开放导管夹具5i返回容器7a之前通过阀8c控制的压力穿过过滤器8b进入废料容器6a中。导管夹具5i允许容器7a的内含物经开放导管夹具5h穿过过滤器单元8a,保留及富集细胞,同时允许废料及碎片在富集细胞返回容器7a之前通过阀8c控制的压力穿过过滤器8b。在发生细胞富集之后,导管夹具5h闭合且导管夹具5j开放以允许容器7a的内含物传递至图3a或图3b中所说明的实施例其中之一。废料容器6a具有悬挂孔6b以在使用和/或运输期间支撑废料容器6a。富集模块的容器7a具有悬挂孔7b以在使用和/或运输期间支撑容器7a。容器7a可在容器7a的内表面上具有圆形边缘7c以减少损耗,损耗可作为向图3a或图3b中所说明的实施例的转移的一部分而发生。导管7d允许容器7a经过滤器单元4a及过滤器单元8a接受容器1a的内含物。导管7e允许容器7a的内含物穿过过滤器单元8a,保留且富集细胞,同时允许废料及碎片在富集细胞经开放导管夹具5i返回容器7a之前通过阀8c控制的压力穿过过滤器8b进入废料容器6a中。导管7f允许容器7a的内含物穿过过滤器单元8a,保留且富集细胞,同时允许废料及碎片在富集细胞返回至容器7a之前通过阀8c控制的压力穿过过滤器8b进入废料容器6a中。

[0482] 图2c说明富集模块的另一个实施例。导管夹具5g允许容器1a的内含物经过滤器单元4a进入柔性容器7a。导管夹具5h允许容器7a的内含物穿过过滤器单元9a,保留及富集细胞,同时允许废料及碎片在富集细胞经开放导管夹具5i返回容器7a之前通过阀9c控制的压力穿过过滤器9b进入废料容器6a中。导管夹具5i允许容器7a的内含物经开放导管夹具5h穿过过滤器单元9a,保留及富集细胞,同时允许废料及碎片在富集细胞返回容器7a之前通过阀9c控制的压力穿过过滤器9b。在发生细胞富集之后,导管夹具5h闭合且导管夹具5j开放以允许容器7a的内含物传递至图3a或图3b中所说明的实施例其中之一。废料容器6a具有悬挂孔6b,以在使用和/或运输期间支撑废料容器6a。富集模块的容器7a具有悬挂孔7b,以在使用和/或运输期间支撑容器7a。容器7a可在容器7a的内表面上具有圆形边缘7c以减少损耗,损耗可作为向图3a或图3b中所说明的实施例的转移的一部分而发生。。导管7d允许容器7a经过滤器单元4a及过滤器单元9a接收容器1a的内含物。导管7e允许容器7a的内含物穿过过滤器单元9a,保留且富集细胞,同时允许废料及碎片在富集细胞经开放导管夹具5i返回容器7a之前通过阀9c控制的压力穿过过滤器9b进入废料容器6a中。导管7f允许容器7a的内含物穿过过滤器单元9a,保留且富集细胞,同时允许废料及碎片在富集细胞返回至容器7a之前通过阀9c控制的压力穿过过滤器9b进入废料容器6a中。过滤器单元9a协助过滤容器7a的内含物的过滤,以在富集细胞返回至容器7a之前通过阀9c控制的压力,通过过滤器9b移除废料培养基及碎片至废料容器6a中。过滤器9b可卷绕成线圈以增加废料在达至废料容器6a之前必须洗脱的距离,从而改良细胞培养基的纯化,而有助于经改良的过滤器9b的输送及储存。

[0483] 图3a说明了稳定化模块的实施例。导管夹具5k允许：如图1中所说明的通过过滤器单元4a或如图2A中所说明的通过过滤器单元4c的容器1a的内含物；或如图2b中所说明的通过过滤器单元8a或如图2C中所说明的通过过滤器单元9a的容器7a的内含物转移至稳定化模块的容器10a中。稳定化模块的容器10a具有悬挂孔10b，以在使用和/或运输期间支撑容器10a。容器10a可在容器7a的内表面上具有圆形边缘10c以减少损耗，损耗可作为转移离开导管10e或10f的一部分而发生。导管10e使得容器10a的内含物能够经连接器10h抽出。导管10f含有柔性膜以使得无菌长钉能够经无菌盖板10g引入，以使得容器10a的内含物能够被抽出。

[0484] 图3b说明稳定化模块的另一个实施例。导管夹具5l允许：如图1中所说明的通过过滤器单元4a或如图2a中所说明的通过过滤器单元4c的容器1a的内含物；或如图2b中所说明的通过过滤器单元8a或如图2c中所说明的通过过滤器单元9a的容器7a的内含物转移至稳定化模块的容器11a中。稳定化模块的容器11a具有悬挂孔11b以在使用和/或运输期间支撑容器10a。容器10a可在容器7a的内表面上具有圆形边缘10c以减少损耗，损耗可作为转移离开导管11f的一部分而发生。导管夹具5m允许培养基3c经无菌过滤器2c进入柔性容器11a。导管夹具5n允许容器11a的内含物取决于导管夹具5o、5p、5q、5r、5s及5t的开放或闭合状态而进入冷藏保存容器12a中的一个。导管夹具5o、5p、5q、5r、5s及5t允许容器11a的内含物进入冷藏保存容器12a中的一个。导管11d使得容器11a能够接收：如图1中所说明的通过过滤器单元4a或如图2a中所说明的通过过滤器单元4c的容器1a的内含物；或如图2b中所说明的通过过滤器单元8a或如图2c中所说明的通过过滤器单元9a的容器7a的内含物。导管11e允许冷藏保存培养基3c转移至容器11a中。导管11f使得容器11a的内含物能够转移至冷藏保存容器12a，其中储存作为单细胞悬浮液的最终解聚UTIL产物以供未来用于快速扩增过程。冷藏保存容器12a具有固定件12b，以允许将TIL从冷藏保存容器12a中无菌转移出去。冷藏保存容器12a具有适合于待储存的UTIL细胞悬浮液的体积的空间12c。冷藏保存容器12a也具有用于将导管11f熔接至冷藏保存容器12a的目标位置12d。

[0485] 图4说明装置及试剂盒的另一实施例。栓钉13a允许悬挂培养基3a、3b及3c。栓钉13b连接至用于悬挂容器1a的重量传感器，且取决于所用的实施例，可包括容器7a、10a和/或11a中的一个或多个。重量传感器用于定义判断阶段，以控制材料的自动化处理。热熔接器13c可用于在将切除的实体肿瘤组织引入容器1a中之后在目标部位密封容器1a。解聚模块13d具有开口，其可闭合且锁住，以使得能够解聚且可将温度控制在0℃至40℃之间（偏差为1℃），以使得能够消化，其中消化酶用于解聚实体肿瘤组织。解聚模块13d还具有内建式传感器以通过测定光分布随时间的不同而鉴别变化，从而评估固体组织解聚水平，且由此鉴别解聚过程的完成，其在数秒至数小时的时间段内发生。解聚模块13d也可包含解聚表面13f，其直接与容器1a接触且顶着解聚模块13d罩壳的背面，该罩壳可在利用酶的解聚及消化期间闭合及锁住。最终调配模块13e具有允许根据所利用的实施例而控制容器10a或11a的温度的罩壳，其能够将温度控制在0℃与周围环境温度之间（偏差为1℃）。导管夹具13g及13j充当输入及输出端口，其安置在导管定位器13i内，且取决于所利用的实施例而促进经解聚的肿瘤产物在容器1a、10a或11a之间的传输。蠕动导管泵13h控制培养基3a或3c在充当输入及输出端口的导管夹具13g与13j之间的转移。导管阀13k有助于通过富集模块中的阀8c及9c控制压力，如图2b及2c中所说明的。取决于所利用的实施例，栓钉13l允许悬挂废料

容器6a和/或冷藏保存容器12a。实施例亦可包括将如图3b中所说明d冷藏保存容器12a连接至装置所需的导管熔接器13m。实施例亦可包括将如图3b中所说明的冷藏保存容器12a与装置断开的导管切割器13n。受控速率冷却模块13o能够冷却或维持在8℃与至少-80℃之间的任何温度以帮助冷藏保存过程。

[0486] 本发明的方法根据以下过程来举例说明。明确指出,除本方法的基本特征外,此处列出的各种可选步骤可以独立组合,以实现与取样类型和要达到的结果相关的相关技术优势。

[0487] 半自动无菌组织处理方法包含:可选地根据本文所描述的试剂盒,根据无菌处理试剂盒上的数码标签识别符自动确定无菌解聚组织处理步骤及一个或多个其他组织处理步骤及其相关条件;将组织样品置放于无菌处理试剂盒的柔性塑料容器中;及通过与以下通信且控制以下自动执行一个或多个组织处理步骤来处理组织样品:解聚模块;可选的富集模块;及稳定化模块。

[0488] 基本上,该过程包含使待接收活检/组织样品(优选为切除的肿瘤)的末端开放袋(第一柔性容器,其为解聚模块的一部分)已经由一个或多个管道连接至或可经人工操作员控制的无菌连接件连接至

[0489] I.具有消化培养基(第二柔性容器,其为解聚模块的一部分)及具有或不具有稳定化溶液(相同的第二柔性容器也是稳定化模块的一部分)的单一容器

[0490] II.具有消化溶液的一个容器(第二柔性容器,其为解聚模块的一部分)及具有稳定化溶液的另一容器(第四柔性容器为稳定化模块的一部分)

[0491] 当添加活检及密封末端开口袋时,消化培养基可经管道或无菌连接件(如权利要求1的管道/端口)添加且处理组织材料。

[0492] 在消化完成时(在此时组织现为单一或少数聚集细胞悬浮液),细胞可以可选地在步骤4之前经过滤(用于过滤的可选的富集模块包含含有样品的第一柔性容器,并过滤至用于接收富集的滤液的第三容器)。

[0493] 在稳定化培养基不存在于同一柔性容器中的情况下,通过打开所附着的导管或手动操作者控制的无菌连接来添加具有稳定溶液的容器以完成,且该连接件要打开以使得能够在两种情况下,该稳定化溶液在过程继续之前被添加。

[0494] 原始柔性容器中的单一或少数聚集细胞悬浮液或其可以可选地再分入多个储存稳定化容器,其后维持在装置上的稳定状态和/或将经历冷藏保存,随后移除以运输、储存和/或用于其最终用途。稳定化模块也包含第一或第三容器,如储存/冷冻/储存中所用。

[0495] 在过程的另一非限制性实施例中:

[0496] a)将通过用于收集所需组织材料的例如活检或手术的单独程序(并非本发明的一部分)收集的组织样品置于初始柔性塑料容器中(参见例如图1,容器1a)。

[0497] b)在使用本发明的以下实施例中的一个或多个解聚之前,将培养基(参见例如图1,培养基3a)转移至解聚腔室中,或在一个实施例还加入且收集酶(参见例如图1,酶3b);诸如重量传感器的机构(参见例如图1,作为模块13d的一部分的13b)评估待添加培养基的所需量,其通过以下确定:直接操作员输入或固体组织的重量。

[0498] c)一次性柔性解聚容器、固体组织、培养基及在一个实施例中的酶在物理解聚过程期间合并最少数秒至若干小时,其中需要在1与10分钟之间的最佳时间,以分解固体组织

直至没有视觉改变为止(参见图5及表1)。解聚装置被设计成使用可变的速度和时间压缩组织,这取决于解聚所花费的时间和通过解聚模块内的传感器进行的反馈(参见图1、13d)。

[0499] d) 在其中存在酶的一个实施例中,这将需要在30与37℃之间的最佳温度下(但可低至0℃至多40℃)持续进行至少1分钟至若干小时,但更优选为15至45分钟的培育期。

[0500] e) 步骤c和在其中酶步骤d)可以重复直到组织停止改变的实施例或所见实施例已经分解成液体细胞悬浮液,无论哪个第一个出现,其通过解聚模块中的传感器(参见图1, 13d)监测。

[0501] f) 在一个实施例中,不完全解聚组织、相关材料及杂质经移除,使得能够通过使用以下实施例中的一个或多个传递解聚组织及培养基来富集细胞悬浮液:

[0502] i. 直接穿过具有至少 $>0.1\mu\text{m}$ 至 $1000\mu\text{m}$,但优选在 $50\mu\text{m}$ 与 $250\mu\text{m}$ 之间,且优选为 $100\mu\text{m}$ 至 $200\mu\text{m}$ 的孔的一个或多个机械过滤器(在图2A中示出)。

[0503] ii. 在具有或不具有细胞对准密度滞留溶液(cell aligned density retention solution)(例如Ficoll-paque GE Healthcare)下使用离心和/或沉积的基于密度的分离。

[0504] iii. 流体动力学过滤,其中流体流动及流动阻碍材料增强基于大小与形状 of 细胞及杂质的解析及分级

[0505] iv. 场流分级,其中施加场(例如流、电、重力、离心)在与选择流垂直或逆向方向上起作用(例如切向流过滤、中空纤维流过滤、不对称流过滤、离心流过滤)。在此情况下:对力反应最大的细胞或杂质被驱动至壁,在此流动最小且因此滞留时间长;而对力反应最小的细胞或杂质对于流动保持分层且快速洗脱(图2B及C中所示的切向流过滤)。

[0506] v. 声泳(acoustophoresis),其中与细胞或杂质的群体调谐或协调的一个或多个声频用于以切线路径驱动所需细胞或杂质至输入流。

[0507] g) 在一个实施例中,经解聚富集的组织产物将再悬浮于新鲜培养基(图2A,使用培养基3a),例如:

[0508] i. 细胞富集培养基,以便进行如之前所描述的独立的靶向富集程序

[0509] ii. 直接细胞培养物或冷储存培养基(例如来自BioLife Solutions的HypoThermosol[®])。

[0510] h) 在g)中采用的实施例中,将再悬浮的解聚固体组织来源产物转移至实施例最终产物容器(图3A中所示)中之一,以储存数小时至数天,随后用于其最终用途。

[0511] i) 否则在步骤f)之后,实施例应用(图3B中所示)将在以下情况中适用:解聚的固体组织来源产物再悬浮于冷藏保护剂(图3B,培养基3c),即用于储存解聚的固体组织来源产物持续数天至数年的冷冻溶液,例如来自BioLife Solution的CryoStor[®]冷冻溶液。

[0512] j) 在此阶段,解聚的固体组织来源产物再悬浮于冷冻溶液中(图4,模块13e)且转移至一个或多个柔性冷藏保存容器(图3A中说明,容器12a)中,且在装置的一个实施例中,存在受控速率冷冻过程(图4,模块13o)。

[0513] k) 其后,袋可与装置及无菌处理试剂盒分开以用于独立储存或分发。

[0514] 在其它实施例中,本发明的一次性试剂盒可与用于组织样品的半自动无菌处理的自动装置一起使用。图6及7描绘了本发明的一次性试剂盒。

[0515] 图6描绘了一种半自动无菌组织处理方法,该方法使用用于不同起始溶液的多个

柔性容器,这些起始溶液是用于解聚和稳定化的过程模块的一部分。

[0516] 过程步骤1-用户可登录装置并使用装置扫描无菌试剂盒上的标签以传送待使用的自动处理步骤。该装置处理器识别标签并提供执行与特定试剂盒有关的特定处理指令所需的信息。

[0517] 过程步骤2-含有消化培养基的柔性袋(解聚模块的一部分)及含有低温/稳定化溶液的柔性袋(稳定化模块的一部分)各自悬挂或紧固至装置。

[0518] 过程步骤3-供处理的活检或组织样品可经由开口端置于无菌试剂盒的柔性容器(两个模块的一部分)中。

[0519] 过程步骤4-可随后使用热熔接封闭开口端(用以在初始处理期间添加样品)来密封包含样品的柔性容器。

[0520] 过程步骤5-使用者随后可与处理器的用户接口互动以确认组织样品存在且在需要时输入任何其他组织材料特定信息。

[0521] 过程步骤6-消化培养基及低温/稳定化溶液柔性容器与容纳样品的柔性容器连接,其后其可置于用于自动处理的装置中。

[0522] 过程步骤7-装置根据试剂盒信息进行循环,执行样品的解聚及所得细胞的稳定化/冷藏。

[0523] 过程步骤8-当稳定化/冷冻时断开并抛弃所使用的试剂盒的培养基及低温/稳定化容器。断开组织在柔性容器中成为单细胞或多细胞溶液的处理,随后在其最终利用之前转移至储存或运输容器中。

[0524] 在另一个实施例中,图7描述包含用于过程中的培养基的柔性容器可在无菌处理试剂盒及方法的模块之间共享。

[0525] 过程步骤1-用户可登录装置且使用装置扫描无菌试剂盒上的标签,以传送待使用的自动处理步骤。

[0526] 过程步骤2-将包含培养基及低温/稳定化溶液的柔性袋(解聚/稳定化模块的一部分)悬挂或以其他方式紧固至装置。

[0527] 过程步骤3-供处理的活检或组织样品可通过开口端置于无菌试剂盒的另一柔性容器(两个模块的一部分)中。

[0528] 过程步骤4-可随后使用热熔接封闭开口端来密封包含样品的柔性容器。

[0529] 过程步骤5-使用者随后可与处理器的用户接口互动以

[0530] 确认组织样品存在且在需要时输入任何组织材料特定信息。

[0531] 过程步骤6-将消化培养基及低温/稳定化溶液柔性容器与容纳样品的柔性容器连接,其后其可置于用于自动处理的装置中。

[0532] 过程步骤7-装置循环以使得能够解聚样品及稳定化所得细胞,可选地经冷藏保存。

[0533] 过程步骤8-当冷冻/稳定化完成时,使用者断开并丢弃试剂盒的所用过的柔性容器。断开在剩余柔性容器中处理成单一或多细胞溶液的组织的连接,随后在其最终用途之前转移至储存或运输容器中。

[0534] 举例而言,在本发明方法的另一个实施例中,在解聚过程补充有酶消化的情况下,用于酶消化的培养基制剂必须补充有帮助蛋白分解,导致细胞至细胞边界分解的酶,如上

文所描述。

[0535] 细胞培养或细胞处理技术中已知的各种液体制剂可作用于固体组织的细胞解聚及酶消化的液体制剂,包括但不限于以下培养基中的一个或多个:器官保存溶液、选择性溶解溶液、PBS、DM EM、HBSS、DPBS、PM I、伊格尔培养基、XVIVO™、AIM-V™、乳酸林格氏液、林格氏乙酸盐溶液、生理盐水、PLASMALYTE™溶液、胶体溶液及IV流体、胶体溶液及IV流体、5%右旋糖水溶液(D5W)、哈特曼溶液DM EM、HBSS、DPBS、RPMI、AIM-V™、伊格尔培养基、XVIVO™,每个可选地补充有额外细胞支持因子,例如胎牛血清、人类血清或血清替代物或其它养分或细胞因子以帮助细胞回收及存活或特定细胞枯竭。培养基可为标准细胞培养基,如以上提及的培养基,或用于例如原代人类细胞培养(例如用于内皮细胞、肝细胞或角质细胞)或干细胞(例如树突状细胞成熟、造血扩增、角质细胞、间叶干细胞或T细胞)的特殊培养基。培养基可具有本领域中公知的补充剂或试剂,例如白蛋白及转运蛋白、氨基酸及维生素、金属离子、抗生素、连接因子、去连接因子、界面活性剂、生长因子及细胞因子、激素或增溶剂。各种培养基可商购自例如ThermoFisher、Lonza或Sigma-Aldrich或类似培养基制造商及供货商。

[0536] 酶消化所需的液体制剂必须具有以至少0.1mM至多50mM,最佳范围2至7mM,理想地5mM存在的足够钙离子。

[0537] 待消化的固体组织可在解聚之后用含有螯合剂EGTA及EDTA的液体制剂洗涤,以移除黏附因子及抑制性蛋白质,随后洗涤且移除EDTA及EGTA,随后酶消化。

[0538] 酶消化所需的液体制剂更佳地具有最少螯合剂EGTA及EDTA,其可通过移除酶稳定性及活性所需的钙离子而严重抑制酶活性。另外,b-巯基乙醇、半胱氨酸及8-羟基喹啉-5-磺酸酯为其他已知抑制性物质。

[0539] 如优选实施例中所描述,用于冷藏保存的最终细胞容器为由弹性可变形材料制成的柔性容器。在装置的此实施例中,最终容器直接转移至-20至-190℃或更低的冷冻器,最佳地位于与装置相关联或分开供应的受控速率冷冻设备(由例如Planer Products或Asymptote有限公司制造)中,其中用于容纳富集解聚的固体组织容器的冷冻腔室及一个或多个柔性储存容器的温度是通过以下控制:注入冷气(通常为氮气,例如Planer products);或通过从一个或多个受控冷却表面移除热。两种方法使得能够以小于1℃或更优选为0.1℃的误差精确地基于冷冻溶液及产物的所希望的存活率控制待冷冻特定细胞所需的速率的冷冻过程。此冷藏保存过程必须考虑冰成核温度,其理想地尽可能接近于冷冻溶液的熔融温度。随后在水性溶液中晶体生长,水作为冰从系统中移除,且残余未冷冻溶液的浓度增加。随着温度降低,更多冰形成,减少残余未冷冻部分,其浓度进一步增加。在水性溶液中,存在较大温度范围,其中冰与浓缩的水性溶液共存。最终通过温度降低,溶液达到玻璃化转变状态,此时冷冻溶液及细胞从黏稠溶液变为固体样状态,低于此温度细胞不会经历进一步生物变化且因此在数年,可能数十年内稳定化,直至需要。

[0540] 可以根据本领域技术人员已知的所有方法培养和/或分析(表征)通过本发明方法获得的解聚细胞产物。

[0541] 将通过本文所公开的方法获得的TIL可用于后续步骤,例如本领域技术人员已知的研究、诊断、组织库、生物库、药理学或临床应用。TIL随后可使用针对本申请的经优化的培养基进行培养,例如通常含有但不限于生长因子(IL-2、IL-7、IL-15、IL-21)或刺激条

件的T细胞混合培养基 (Cellular Therapeutics), 例如涂布有抗体的盘或聚苯乙烯珠粒。在本发明中, 将经分离的细胞接种至培养容器中且使用本领域技术人员标准化使用的程序维持, 例如潮湿氛围 (1%至20%通常5%CO₂, 80%至99%通常95%空气), 温度在1至40℃之间, 通常37℃, 持续数周, 且可添加补充剂, 补充有10%FBS及3000IU/mL的IL-2。

[0542] 经富集的TIL可在细胞培养之前和/或之后用作疗法, 例如细胞疗法或疾病的预防中的医药组合物。医药组合物可用于治疗和/或预防哺乳动物、尤其人类的疾病, 可能包括向哺乳动物施用药学上有效量的医药组合物。

[0543] 除调配为用于治疗各种癌症的药品以外, 此类TIL培养物也可用于研究例如细胞功能、肿瘤细胞杀灭、细胞信号传导、生物标记、细胞路径、核酸及可用于鉴别供体、组织、细胞或核酸状态的其他细胞或组织相关因子。

[0544] 疾病可为任何疾病, 其可通过固体组织来源的细胞的存在和/或通过增加相关细胞在相关位置 (即肿瘤或疾病部位) 中/处的浓度来治疗和/或预防。所治疗和/或预防性地治疗的疾病可为任何病症, 例如癌症或退化性病症。治疗可为经富集、工程化或扩增的细胞或这些细胞的任何组合的移植, 及施用至身体相关部分或全身供应。

[0545] 本发明的医药组合物可通过适合于待治疗 (或预防) 的疾病的方式施用。施用的数量及频率将由例如患者的状况以及患者疾病的类型及严重程度的因素来决定, 尽管适当剂量可通过临床试验来确定。

[0546] 如本文所描述, 本发明提供一种试剂盒, 其允许接收、处理、储存和/或分离材料, 例如组织, 尤其是哺乳动物组织。此外, 本发明提供试剂盒的组件, 诸如柔性容器, 例如袋、过滤器、阀、支架、夹具、连接器和/或管道, 诸如导管。尤其地, 袋可耦接于导管的一个或多个管或区段, 其经调适以使得组织材料能够在冷藏保存试剂盒的各种组件之间流动。

[0547] 使用冷藏保存试剂盒和/或收集袋的组织处理为细胞可包括自动化和/或半自动化装置及方法。

[0548] 此外, 通过利用本文所述的袋、试剂盒、装置及过程, 结合本领域中一般的技能, 可容易地识别本发明的其他实施例。本领域的技术人员将容易地理解已知变化形式。

[0549] 设计专利申请案序列号29/740, 293提供适用于组织收集的组织收集袋。本发明的组织收集袋的顶部为开放的, 用于接收组织, 例如组织活检, 诸如动物 (例如家畜, 诸如狗或猫) 或人类癌组织。组织收集袋应与其中所收集的组织一起密封, 且用于在其中处理如此密封的组织 (例如处理可包括搅拌和/或压缩, 例如平缓搅拌和/或压缩) 和/或酶消化其中组织。有利地, 其中的组织处理及所需材料 (诸如肿瘤浸润淋巴细胞 (TIL)) 的提取可在封闭系统中。有利或优选的实施例可包括指示收集组织所来自的患者的标志和/或展示在仪器中收集袋可夹持或贴附就位以施加搅拌的位置的标志和/或展示收集袋可例如通过热密封 (其可为用于处理的仪器的一部分) 密封的位置的标志。有利地, 在施加处理之前, 将收集袋夹持或贴附至仪器中以供处理和/或密封, 例如热密封。在某些说明中, 导管可用虚线或点画展示, 以展示导管未必被视为本发明设计的一部分; 但在某些实施例中可视为本发明设计的一部分。虚线或点画应解释为导管可存在或不存在且可主张为其中的一者或两者, 即在整个附图中, 导管可形成本发明设计的一部分 (且也不一定是本发明设计的一部分)。另外, 尽管某些说明未展示标志, 可指示获得的样品所来自的患者, 可指示获得的样品所来自的患者及组织收集袋可夹持或贴附于仪器中的位置的标志, 及可指示获得的样品所来自的

患者及组织收集袋可夹持或贴附于仪器中的位置及组织收集袋可密封(例如热密封)的位置的标志。应理解,本发明设计可包括其变化形式,例如本发明设计可包括可指示获得的样品所来自的患者及组织收集袋可热密封的位置的标志而不展示组织收集袋可夹持或贴附于仪器中的位置的标志;且本发明设计可包括可指示组织收集袋可热密封的位置的标志和/或展示组织收集袋可夹持或贴附于仪器中的位置的标志而不指示获得的样品所来自的患者的标志(包括患者标志可在正使用时压印于组织收集袋上,而关于夹持或贴附或热密封的标志在使用之前可已在组织收集袋上)。包括任何相关联导管的组织收集袋一般可为澄清或透明或半透明或任何所期望的颜色。包括任何相关联导管的组织收集袋通常可以类似于以下的制造的方式制造:封闭或密封、血液收集、组织培养、生物处理或冷藏保存袋及相关联导管。本发明中的相关联导管可自任何所期望材料与聚氯乙烯(PVC)或包括PVC的材料作为所需材料构筑,因为其有利于熔接和/或密封。用于接收组织的本发明的组织收集袋的部分可自任何所需材料与乙烯醋酸乙烯酯(EVA)或包括EVA的材料作为所需材料制成,因为其有利于热密封。

[0550] 图11A中示出了用于处理组织(例如组织的解聚、富集和/或稳定化)的试剂盒2的实施例。待处理的组织可包括固体真核生物,尤其哺乳动物组织,诸如来自样品和/或活检的组织。试剂盒2包括诸如袋4、6的组件,诸如收集袋4及冷藏保存袋6。如图11A-D中所描绘的试剂盒可用于自动或半自动装置以用于处理。

[0551] 在一些实施例中,试剂盒组件可包括指示符,诸如代码、字母、字组、名称、字母数字代码、数字、影像、条形码、快速响应(QR)码、追踪器(诸如智能型追踪器和/或蓝牙追踪器)、标签(诸如射频标签和/或其他数码可识别的鉴别标签),使得其可在自动化和/或半自动化处理期间,诸如在本发明的实施例中在自动化装置内被扫描及识别。举例而言,标签可提供关于需要自动处理的条件和/或步骤的信息。举例而言,扫描诸如袋的试剂盒组件可允许与试剂盒一起使用的自动化系统处理组织而无进一步干预和/或污染。尤其地,已将组织样品置放于收集袋中以供在装置的解聚组件中处理。收集袋可在处理开始之前密封。在一些实施例中,收集袋可在处理开始之前使用能量,诸如热、射频能量、高频(HF)能量、介电质能量和/或本领域中已知的任何其它方法人工和/或自动密封。

[0552] 在一些实施例中,具有加热棒的热封机(例如, Van der Staehl MS-350, Uline H-190 Impulse 密封机或本领域已知的类似密封机),加热棒可用以在袋上产生密封口。

[0553] 在一特定实施例中,当使用热封机时,在低于约100℃的温度下且在约0.8巴至约2.8巴的范围内的压力下形成密封可为有利的。此高温及压力可施加约八秒,其后温度可降低,但在一些实施例中,压力持续施加约2至3秒。温度、压力及时间的值将基于形成袋的材料配方,尤其是形成密封口的材料而变化。举例而言,另一材料可能需要密封机达到高于约210°F (98.9℃)的温度最少约3秒,之后可在移除加热棒之前使加热棒冷却5秒。

[0554] 待密封的材料的位置对于所形成密封的强度而言可为关键的。举例而言,待密封材料中的不完全密封、褶皱、通道和/或间隙可降低密封的强度。

[0555] 可使用密封剥离测试(即ASTM F88/F88M)和/或爆发测试(即ASTM F1140/F1140M或ASTM F2051/F2054M)来测试密封的强度。

[0556] 在一些实施例中,当适当密封且当位于用于处理和/或加工的装置内并进一步用夹具紧固时,袋或柔性容器可在使用期间耐受100牛顿的力。袋或柔性容器实施例可经构筑

以适当密封且当位于用于处理和/或加工的装置内并进一步用夹具紧固时在使用期间耐受75牛顿的力。

[0557] 如图11A中所示,试剂盒2包括其中可处理收集袋5的解聚组件4、过滤器9可位于其中的富集组件8及其中使用冷藏保存袋7以保存所需材料的稳定化组件6。在试剂盒2的组件(诸如收集袋5)中,组织得到处理。举例而言,收集袋5可用于来源于真核细胞的固体组织的解聚。组织可通过使得大部分所得组织在处理之后可为单个细胞和/或小细胞数目聚集体的方式处理。另外,处理可在试剂盒和/或尤其是收集袋中进行。

[0558] 经处理组织的富集可在过滤器9中的富集组件8处进行。过滤器9可经选择以使得进入导管11的经过滤组合物(即所需材料)可具有大小预定的组分。过滤器9可经选择以使得进入导管11的所需材料组合物可具有诸如平均大小小于约200 μm 的肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)的组分。尤其地,在一个实施例中,所需材料可包括平均大小小于约170 μm 的肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)。

[0559] 在一些实施例中,所需材料可包括介于约15 μm 至约500 μm 的范围内的肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)。举例而言,在一个实施例中,过滤器9可经配置以使得进入导管11的组织组合物具有平均大小小于约200 μm 的组分。尤其地,在过滤之后离开过滤器及进入导管11的所需材料可具有平均大小小于约170 μm 的组分。

[0560] 在一些实施例中,过滤器9经配置以使得进入导管11的经过滤的组合物具有大小在约50 μm 至约300 μm 范围内的组分。举例而言,在一个实施例中,过滤器9可经配置以使得进入导管11的组织组合物具有平均大小在约150 μm 至约200 μm 范围内的组分。

[0561] 如图11A中所示,用于处理组织的系统的稳定化组件6中冷藏保存袋7可用于稳定化组织组合物以用于储存和/或运输。

[0562] 图11B描绘具有阀12、13的试剂盒2。阀可为无针阀。阀12、13可用于提供酶培养基,诸如肿瘤消化培养基、冷藏保护剂和/或冷藏保存培养基。尤其地,阀12可用于向导管10提供酶培养基。酶培养基可移动至收集袋4以辅助处理置放于袋5中的组织。

[0563] 阀13可用于向导管11提供诸如DMSO溶液的冷藏保护剂,以使得DMSO溶液可移动至冷藏保存袋7。在一些实施例中,诸如DMSO溶液的冷藏保护剂可与进入导管11的经过滤材料混合,使得DMSO溶液与经过滤材料的组合组合物进入冷藏保存袋7。进入导管11的经过滤材料可包括诸如具有预定平均大小的肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)的组分。举例而言,在一些实施例中,经过滤组合物中的组分的平均大小可小于约200 μm 。

[0564] 在一些实施例中,如图11C中所展示,试剂盒2包括过滤器9周围的夹具14以确保阻止和/或防止经由阀12、13提供的材料流入过滤器9中。阀13可用于向导管11提供冷藏保护剂以使得冷藏保护剂可与自过滤器9进入导管11的经过滤材料混合。举例而言,夹具14可经定位以阻止和/或防止冷藏保护剂在过滤器9的方向上流动。在一些实施例中,在经过滤溶液开始从过滤器9流动之后,将释放夹具14以使得冷藏保护剂与经过滤材料的组合物在稳定化组件6处进入冷藏保存袋7。进入导管11的经过滤材料可包括诸如具有预定平均大小的肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)的组分。举例而言,在一些实施例中,经过滤组合物中的组分的平均大小可小于约200 μm 。

[0565] 试剂盒2的实施例可包括如图11D中所示的冷藏保存袋7上的端口16。可使用端口添加和/或自冷藏保存袋7移除材料。举例而言,可自冷藏保存袋移除测试样品。

[0566] 图12A展示用于试剂盒的袋22的实施例的透视图。袋22可包括连接器24、开放区段26、密封区段21以及定位器23。连接器24可用于将袋22耦接于导管25。定位器23可为袋22中的开口。

[0567] 袋(诸如收集袋和/或冷藏保存袋)及任何相关联导管可为大体上澄清、透明、半透明、任何所要颜色或其组合。袋(例如收集袋和/或冷藏保存袋)和/或导管通常可以类似于封闭和/或密封血液和/或冷藏保存袋及相关联导管的制造的方式制造。

[0568] 用于本文中所描述的本发明的袋包括收集袋及冷藏保存袋,可包括由预定材料制成的至少一部分,该预定材料诸如热塑性、聚烯烃聚合物、乙烯-醋酸乙烯酯(EVA)、混合物(诸如共聚物,例如乙酸乙烯酯及聚烯烃聚合物混合物(即OriGen Biomedical EVO膜))、包括EVA的材料和/或可密封塑料的共挤层。

[0569] 可针对特定特性和/或一系列特性选择供用于袋的材料,例如密封性(诸如归因于热熔接或使用射频能量的密封性)、透气性、柔性(例如低温柔性(例如在-150℃或-195℃下))、弹性(例如低温弹性)、耐化学性、光学透明度、生物兼容性(诸如细胞毒性)、溶血性活性、抗浸出性、具有低微粒、针对特定气体(例如氧气和/或二氧化碳)的高传输速率和/或符合监管要求。举例而言,当根据ASTM D-638中所概述的拉伸强度测试方法测试时,用于袋的材料可经选择具有大于约2500psi(172巴)的拉伸强度。尤其地,当根据ASTM D-638中所概述的拉伸强度测试方法测试时,柔性容器(诸如袋)的实施例使用具有大于约2800psi(193巴)的拉伸强度的材料。

[0570] 在一些实施例中,可针对用于形成袋的至少一个层的共挤材料的特定特性选择材料。层可经构筑以使得当构筑时,袋的内部层为相对生物兼容的,即袋的内表面上的材料为稳定的且不渗入至袋的内含物中。

[0571] 举例而言,可用以选择用于诸如收集袋、冷藏保存袋和/或相关联导管的试剂盒组件的材料的相关特性可关于密封,例如热密封。

[0572] 可使用密封剥离测试(即ASTM F88/F88M)和/或爆发测试(即ASTM F1140/F1140M或ASTM F2051/F2054M)来测试密封的强度。

[0573] 在一些实施例中,袋或柔性容器在适当密封且定位于用于处理和/或加工的装置内并进一步用夹具紧固时可在使用期间耐受100牛顿的力。袋或柔性容器实施例可经构筑以在适当密封且当定位于用于处理和/或加工的装置内并进一步用夹具紧固时,在使用期间耐受75牛顿的力。

[0574] 袋(尤其是收集袋和/或保存袋)的尺寸可特定于用于进行处理和/或加工的装置。袋的大小应基于用于进行处理的一个或多个装置的配置和/或大小进行调整。应特别注意延伸超过袋的边界的任何组件(例如端口、连接器或其类似物)的放置和/或大小。诸如端口的组件可干扰用于进行处理和/或加工的装置的操作。此外,应注意确保袋的厚度与机器的要求一致,尤其对于密封材料,诸如所制造的密封口。

[0575] 本发明中的导管可由任何所期望的材料构筑,包括但不限于聚氯乙烯(PVC)。举例而言,PVC可为所期望的材料,因为PVC有利于熔接和/或密封。

[0576] 在一些实施例中,如图12A-12E、13A-13E、14、20A-20E、21A-21E、22A-22D、27A、28、33及34中所描绘的,收集袋的至少一个末端可以打开,以用于接收组织。尤其地,在一个实施例中,例如来自活检的组织样品可经开口端(例如顶部末端)置于袋中。在一些情况下,活

检样品可为来自动物(例如家畜,诸如狗或猫)或人类的癌组织。

[0577] 如图12A中所示,袋22可用作组织收集袋。举例而言,在组织置于袋中之后,袋可经密封,且随后可经处理。处理可包括组织在袋中搅拌,例如平缓搅拌、提取和/或酶消化。可在封闭系统中进行组织处理及自其提取所期望材料(诸如肿瘤浸润淋巴细胞(TIL))。有利或优选实施例可包括指示所收集的组织所来自的患者的指示符和/或展示在仪器中收集袋可夹持、密封、受装置作用和/或贴附就位的位置的标记。

[0578] 在一些实施例中,袋22可由可密封材料形成。举例而言,袋22可由包括但不限于聚合物的材料形成,这些聚合物例如合成聚合物,包括脂族或半芳族聚酰(例如,尼龙)、乙烯-醋酸乙烯酯(EVA)及其混合物、乙酸乙烯酯及聚烯烃聚合物混合物、热塑性聚氨酯(TPU)、聚乙烯(PE)和/或聚合物组合。袋的一部分可使用能量,诸如热、射频能量、高频(HF)能量、介电质能量和/或本领域中已知的任何其他方法密封和/或熔接。

[0579] 收集袋可用作处理和/或解聚袋。收集袋可具有在约4cm至约12cm范围内的宽度及在约10cm至约30cm范围内的宽度。

[0580] 举例而言,用于处理的收集袋可具有约7.8cm的宽度及约20cm的长度。尤其地,袋可为可热密封的,例如使用EVA聚合物及其混合物、乙酸乙烯酯及聚烯烃聚合物混合物和/或一种或多种聚酰胺(尼龙)。

[0581] 如图12A中所描绘,袋22可用作组织收集袋,用于将组织密封于其中,以供用于本发明的处理。

[0582] 图12B展示用作组织收集袋的袋22的实施例的透视图。组织可密封于袋中且随后进行处理。如图12B中所示的袋22可用指示符27、28标记,例如患者识别符,其可鉴别患者,已从该患者获取或获得组织样品或活检。

[0583] 指示符可包括但不限于代码、字母、字组、名称、字母数字代码、数字、影像、条形码、快速响应(QR)码、标签、追踪器(诸如智能型追踪器标签或蓝牙追踪器)和/或本领域中已知的任何指示符。在一些实施例中,指示符可印刷于、蚀刻于和/或黏附于试剂盒的组件的表面上。举例而言,指示符可直接印刷于试剂盒的至少一个组件的表面上,如图12B中所示。指示符亦可使用黏着剂定位于袋上,例如,贴纸或追踪器可置放于一个袋上和/或多个袋上。举例而言,如图12B所展示,袋22包括多个指示符28(数字码)、27(QR码)。

[0584] 图12C展示用作组织收集袋的袋的透视图。组织可插入至袋22中以供处理。指示符可用于鉴别获取或获得的组织样品和/或活检所来自的患者。如图12C中所展示,指示符27、28包括用于追踪样品、定位样品和/或追踪在过程中样品的状态的QR码及鉴别数字。举例而言,在一些实施例中,指示符可用于定位实验室中任何给定位置的样品。指示符可在使用之前和/或期间置于袋上,例如,在袋被取出以供与样品一起使用时,患者指示符可压印至袋上。此外,袋22可包括标记29。标记可用以展示应在何处定位密封、夹具和/或仪器。

[0585] 指示符(例如QR码、诸如智能型标签的标签和/或追踪器)可用于鉴别袋内的样品以及发指令给装置的处理程序,以使得装置根据在冷藏保存试剂盒中进行的解聚、富集和/或稳定化过程类型运行特定程序。不同类型的培养基可用于这些过程中,例如可允许受控冷冻速率的酶培养基、肿瘤消化培养基和/或冷藏保存培养基。在一些实施例中,冷藏保存试剂盒和/或其组件可包括可由自动化装置读取的指示符。装置随后可执行用于在插入至此类装置时处理组织的特定全自动方法。本发明特别适用于样品处理,特别是自动化处理。

[0586] 在一些情况下,本文所述的冷藏保存试剂盒和/或其组件可为单次使用的。冷藏保存试剂盒和/或其组件可用于自动化和/或半自动化过程中以用于细胞或细胞聚集体的解聚、富集和/或稳定化。在一些实施例中,诸如收集袋的用于冷藏保存试剂盒中的袋可在一些实施例中用于多个过程。举例而言,收集袋可在不同位置重复密封以产生用于处理组织样品(诸如活检样品和/或固体组织)的单独区室。

[0587] 另外,标记可置放于袋(诸如组织收集袋)上的各种位置处以指示袋可密封、夹持和/或贴附至对象的位置。在一些实施例中,展示袋可夹持、密封和/或贴附至对象(诸如仪器)的位置的标记可在使用之前安置于袋上。举例而言,一个或多个标记可在制造期间定位于袋上。

[0588] 密封口可用能量(例如热)在使用期间形成以产生熔接区。在使用期间形成的密封口可具有在约2.5mm至约7.5mm范围内的宽度。一般而言,在将组织材料置放于袋140中之后形成密封口140且可具有约5mm的宽度。

[0589] 可使用密封剥离测试(即ASTM F88/F88M)和/或爆发测试(即ASTM F1140/F1140M或ASTM F2051/F2054M)来测试密封的强度。

[0590] 在一些实施例中,袋或柔性容器在当适当密封且当定位于用于处理和/或加工的装置内且进一步用夹具紧固时可在使用期间耐受100牛顿的力。袋或柔性容器实施例可经构筑以在当适当密封且当定位于用于处理和/或加工的装置内且进一步用夹具紧固时在使用期间耐受75牛顿的力。

[0591] 当在柔性容器(诸如袋,例如收集袋和/或冷藏保存袋)上形成密封口或熔接口时,密封装置可用于取决于袋的材料,在预定温度、压力及时间量下施加热和/或压力。举例而言,一些热封机可能需要施加热及压力约八秒。在8秒之后,可关断装置的热,然而,可施加压力额外2至3秒。

[0592] 图12D展示用于密封其中组织以供用于本发明的处理的组织收集袋的实施例的透视图。指示符27、28定位于袋22上,使得使用者可在使用期间容易地鉴别患者。此外,这些指示符可用于鉴别袋中的材料以及追踪袋中的材料的特定处理方法期间的进展。在一些实施例中,袋在处理期间在袋中容纳约0.1ml至约25ml范围内的培养基体积及约0.1ml至约10ml范围内的组织体积。在处理期间袋中培养基体积与组织体积之比应在约1.0至约2.5的范围内。在一些实施例中,培养基体积与组织体积之比在约1.7至约2.3的范围内。尤其地,培养基体积与组织体积之比在约2.0至约2.2的范围内。

[0593] 如图12D中所示,标记29接近袋22的开口端26定位。在使用期间,标记29可基于用于处理组织样品和/或活检样品的方法安置于袋上。在使用期间,例如基于正使用或待使用的处理方法和/或待使用的设备,可将标记置放于袋上。在一些实施例中,可在制造期间将标记定位于袋上。举例而言,关于密封和/或夹持位置的标记定位可基于处理方法和/或待处理组织的体积而变化。

[0594] 图12E展示组织收集袋的透视图。组织可密封于袋22中处理。连接器24可提供向袋子的通路。如所示,连接器24可使用导管25连接至其他装置,诸如过滤器、袋等。端口20可用于在使用期间从袋22获取样品和/或提供来自袋22的材料。

[0595] 图13A展示用于组织收集的袋的正视图。组织可在使用期间密封在袋内。袋30可制造成具有密封边缘31。如图13A中所展示,密封边缘31可位于三个边缘上,且第四边缘可包

括开放区段36。

[0596] 袋30上的定位器33可用于定位袋。举例而言,一个或多个定位器可用以确保袋在使用期间可适当地处理,例如被置于接近于仪器处。在一些系统中,定位器可有助于本文中描述的袋在自动化系统中的使用。尤其地,定位器可用于使袋移动穿过自动化系统。

[0597] 如图13B中所示,袋30可具有用于鉴别样品的指示符36、37,例如鉴别获取或获得的组织样品和/或活检所来自的患者。使用诸如QR码的指示符37可允许追踪特定样品的过程步骤,使得有可能在给定过程中跟踪样品。

[0598] 图13C示出组织收集袋的正视图。组织可密封在袋内且在其中加以处理和/或加工。袋30可具有用于鉴别样品的指示符37、38,例如鉴别获取或获得的组织样品或活检所来自的患者的指示符。使用诸如QR码的指示符37可允许追踪特定样品的过程步骤,使得有可能在给定过程中跟踪样品。定位器33可用于定位袋30以供处理。连接器34可允许组织、经处理组织等通过导管35耦接于其他装置。

[0599] 图13D描绘具有用以鉴别样品的指示符37、38的组织收集袋的正视图。使用诸如QR码的指示符37可允许追踪特定样品的过程步骤,使得有可能在给定过程中跟踪样品。标记39和/或定位器33可用于在加工和/或处理期间控制袋的定位。接近于开口端置放标记以指示在使用期间将袋定位、密封和/或夹持于何处。袋30可制造成具有密封边缘31。如图13D中所展示,密封边缘31可位于三个边缘上,且第四边缘可包括开放区段36。

[0600] 图13E展示在组织置放于其中之后能够密封的组织收集袋的正视图。连接器34及端口32可提供对袋的进出。一个或多个端口可定位于收集袋上,使得端口允许输入培养基和/或试剂和/或从袋提取样品。

[0601] 如所展示,连接器34可使用导管35耦接于诸如过滤器、袋等的其他装置。视用途而定,可将标记及指示符置放于袋的一个或多个侧面。尤其地,如图13E所示,定位器33、标记39和/或指示符37、38可用于对袋30进行定位以供处理,诸如施加搅拌、例如通过热密封(其可为用于处理的仪器的一部分)密封、添加材料以供处理和/或提取。有利地,在施加处理之前,将收集袋夹持或贴附至仪器以供处理和/或密封,例如热密封。

[0602] 图14展示用于组织收集的袋的后视图。尤其地,袋40能够在组织安置于其中的情况下密封且加以处理。密封口可接近于开口端46且实质上平行于其而定位。如所展示的,连接器44可使用导管46连接至其他装置,诸如过滤器、袋等。袋40可制造成具有密封边缘41。如图14中所示,密封边缘41可位于三个边缘上,且第四边缘可包括开放区段46。定位器43可由所制造密封边缘41围绕。

[0603] 图15描绘能够在其中密封组织且允许在使用袋期间处理组织的、用于组织收集的袋50的侧视图。袋50可通过连接器52耦接于导管54。

[0604] 图16A示出了未密封组织收集袋的俯视图。袋60可包括密封部分66及开放部分64。连接器62通过袋60可见。在将组织置放于袋60的顶部的袋开放部分中之后,袋可密封。

[0605] 图16B示出了具有用于密封其中的组织以供处理的密封边缘66的组织收集袋60的底视图。连接器62在袋60上可见。

[0606] 图17A示出了部分开放的袋的俯视图。袋70可包括密封部分76及开放部分74。连接器72通过袋70可见。在将组织置放于袋70的顶部的袋开放部分中之后,袋可密封。

[0607] 图17B示出了用于密封其中的组织以供处理的组织收集袋的底视图。连接器72在

袋70上可见。

[0608] 图18A描绘部分开放的袋的俯视图。组织可通过袋80的开口端84插入。连接器82展示为安置于袋80的底部。

[0609] 图18B示出了用于收集和/或处理组织的完全开放的袋的俯视图。袋80的开口端84可接收用于加工(诸如处理、分离和/或分开)的组织。可在制造期间产生密封边缘86。

[0610] 图19A描绘在袋侧面上具有密封边缘96的部分开放的袋90的俯视图。如所示,组织可经袋90的开口端94插入。连接器92展示为安置于袋90的底部。

[0611] 图19B示出了在袋侧面上具有密封边缘96的、用于收集和/或处理组织的完全开放的袋的俯视图。袋90的开口端94可接收用于加工(诸如处理、分离和/或分开)的组织。连接器92展示为安置于袋94的底部。

[0612] 图20A-20E示出了组织收集袋的实施例的正视图。如图20A中所示,具有密封边缘101及开口端102的袋100可经导管105和/或连接器104连接至装置(未描绘)。举例而言,连接器104安置于袋100中,而y型连接器106可沿着导管安置。图20B展示包括袋100的另一个实施例,包括指示符107、108,以使得使用者可以鉴别获取或获得的组织样品或活检所来自的患者。

[0613] 另外,包括标记109及指示符107、108的袋100的实施例描绘于图20C中。定位器103的使用可允许袋的一致定位,其允许袋内的组织的一致处理。指示符107、108通过样品和/或患者信息鉴别样品。在一些情况下,指示符可用于鉴别和/或追踪样品,诸如组织样品和/或活检样品。图20D描绘具有多个指示符107、108及标记109的袋100。标记可展示袋100应密封的位置。举例而言,标记109可指示袋100应密封、夹持和/或耦接于另一装置的位置。密封的标记可接近于袋的开口边而定位,例如,此类标记可距开口边预定距离而定位。在一些实施例中,密封的标记可实质上平行于开口边。如所展示,袋100可包括连接器104及导管105。

[0614] 在一个实施例中,如图20E中所示,袋100包括端口110及连接器104。端口可允许材料的添加和/或材料从样品的移除。举例而言,在组织处理期间,可在整个处理中多次获取样品。另外,端口110可允许培养基和/或试剂无菌输入至袋100中。

[0615] 图21A展示用于收集和/或处理组织的袋100的正视图。组织可经由开口端102置放于袋100中。连接器104可用于将袋100与导管105及夹具112耦接。

[0616] 图21B-21E示出了袋100的额外实施例的正视图。图21B-11D示出了包括指示符107、108和/或标记109的各种配置。袋可包括指示符,诸如代码、字母、字组、名称、字母数字代码、数字、影像、条形码、快速响应(QR)码、标签、追踪器(诸如智能型追踪器标签或蓝牙追踪器)和/或本领域中已知的任何指示符。在一些实施例中,指示符可印刷于、蚀刻于和/或黏附于试剂盒的组件的表面上。指示符亦可使用黏着剂定位于袋上,例如,贴纸或追踪器可置放于一个袋上和/或多个袋上。收集袋和/或冷藏保存试剂盒可包括多个指示符,诸如数字码和/或QR码。

[0617] 指示符(例如QR码、诸如智能型标签的标签和/或追踪器)可用于鉴别袋内的样品以及发指令给装置的处理器,以使得装置根据在冷藏保存试剂盒中进行的解聚、富集和/或稳定化过程类型运行特定程序。

[0618] 图21E描绘用于收集、加工、处理和/或分离材料的袋100的另一个实施例的正视图。待处理的组织可密封在袋100内。导管105可经连接器104将袋100耦接于夹具112。端口

114可允许输入和/或自袋100移除。举例而言,端口可允许取样和/或允许将培养基和/或试剂无菌输入至柔性容器(诸如冷藏保存试剂盒的袋)中。

[0619] 图22A展示具有密封边缘121的、用于密封其中组织以供处理的组织收集袋120的另一个实施例的正视图。袋120包括耦接于导管125的定位器123及连接器124。

[0620] 图22B展示具有密封边缘121及开口端122的组织收集袋120的正视图。指示符127、128可定位于袋120上以使得其可容易地由自动化系统获取。定义定位器123的开口可由密封边缘121环绕。指示符可以用于鉴别获取或获得的组织样品或活检所来自的患者。

[0621] 如图22C中所示,袋120包括指示符127、128及标记129。图22D描绘具有多个标记129的收集袋120。密封的标记可接近于袋的开口边而定位。此类标记可距开口边预定距离而定位。在一些实施例中,密封的标记可实质上平行于开口边。

[0622] 图23描绘经安置以使得在页面的顶部处展示袋130的底部的密封袋130的正视图,其中导管135从连接器134延伸而出。袋130包括袋130的密封部分131上的指示符137。可在袋130的密封期间和/或之后安置密封部分上的指示符。一般而言,袋在提供组织之后密封。袋130的表面上的指示符138可为条形码。定位器133可接近于连接器134定位。

[0623] 袋(诸如收集袋和/或冷藏保存袋)及任何相关联导管可为大体上澄清、透明、半透明、任何所要颜色或其组合。组织收集袋和/或导管通常可以类似于封闭和/或密封血液和/或冷藏保存袋及相关联导管的制造的方式制造。本发明中的导管可由任何所需材料构筑,包括但不限于聚氯乙烯(PVC)。举例而言,PVC可为所期望的材料,因为PVC有利于熔接和/或密封。

[0624] 收集袋,诸如本发明的组织收集袋可包括由预定材料制成的、用于接收组织的袋的至少一部分,该预定材料诸如聚烯烃聚合物、乙烯-醋酸乙烯酯(EVA)、共聚物(诸如乙酸乙烯酯及聚烯烃聚合物混合物(即OriGen Biomedical EVO膜))和/或包括EVA的材料。可针对特定特性和/或一系列特性选择供用于袋的材料,例如密封性(诸如热密封性)、透气性、柔性(例如低温柔性)、弹性(例如低温弹性)、耐化学性、光学透明度、生物兼容性(诸如细胞毒性)、溶血性活性、抗浸出性、具有低微粒。

[0625] 如图24中所示,袋140可包括多个标记141、142,这些标记经放置以使得若包括标记的区域经密封,则区室143可形成于袋140中。袋140具有在袋制造期间形成的预熔接区段145,其可用于在使用期间形成样品的区室。图24描绘收集袋的实施例,其能够被形成,以使得其具有多个区室。各区室可通过置放多个密封口和/或熔接口(例如热密封)形成于袋中。举例而言,在将肿瘤悬浮液置放于收集袋中之后,使用诸如热量的能量,可熔接封闭开口端,且可熔接额外标记141(诸如熔接线142)以形成区室。

[0626] 袋140上的定位器143确保袋相对于仪器(诸如密封装置,如RF热封机和/或注射器)恰当地定位。

[0627] 密封口可用能量(例如热)在使用期间形成以产生熔接区。在使用期间形成的密封口可具有在约2.5mm至约7.5mm范围内的宽度。一般而言,在将组织材料置放于袋140中之后形成密封口140且可具有约5mm的宽度。

[0628] 可使用密封剥离测试(即ASTM F88/F88M)和/或爆发测试(即ASTM F1140/F1140M或ASTM F2051/F2054M)来测试密封的强度。

[0629] 在一些实施例中,袋或柔性容器当适当密封,且当定位于用于处理和/或加工的装

置内并进一步用夹具紧固时,可在使用期间耐受100牛顿的力。袋或柔性容器实施例可经构筑,以当适当密封且当定位于用于处理和/或加工的装置内并进一步用夹具紧固时,在使用期间耐受75牛顿的力。

[0630] 当在柔性容器(诸如袋,例如收集袋和/或冷藏保存袋)上形成密封口或熔接口时,取决于袋中使用的材料,密封装置可在预定温度、压力及时间量下施加热和/或压力。举例而言,一些热封机可能需要施加热及压力约八秒。在8秒之后,可关断装置的热,然而,可额外施加压力2至3秒。

[0631] 在一些系统中,定位器可有助于本文中所描述的袋在自动化系统中的使用。因此,已置放于袋140中的组织可分成单独的区室144、146、147。如所示,各区室144、146、147分别包括端口148、149、150。各端口可允许直接进入区室。此可允许个别化添加、储备和/或测试样品。例如,密封收集袋可有助于针对复杂样品的适合性和/或微生物特性对TIL进行储备及测试。因为此类型的测试可能需要将消化材料的较小等分试样冷冻在收集袋中,使得可单独解冻消化材料的较小等分试样。在一些实施例中,如图24中所描绘的袋140可用作收集袋和/或冷藏保存袋。

[0632] 图25示出了收集袋的实施例的正视图。在此实施例中,收集袋152的长度为约150mm(即15cm)且宽度为约90mm(即9cm)。袋152包括充当定位器160的开口。一个或多个定位器可用于控制袋的定向以确保袋经恰当地定位以供在使用期间进行加工和/或处理,例如接近于仪器定位。在一些系统中,定位器可有助于本文中所描述的袋在自动化系统中的使用。尤其地,定位器可用于使袋移动穿过自动化系统。密封口156为约5mm。密封口可使用能量(例如热)在使用期间形成以产生熔接区。密封口可具有在约2.5mm至约7.5mm范围内的宽度。一般而言,在将组织材料置放于袋152中之后形成密封口156。如图25中所示,袋152具有在袋制造期间形成的预熔接区段158。

[0633] 如图26中所示,收集袋可耦接于导管及阀。在一些实施例中,袋可具有在约10cm至约50cm范围内的长度。尤其地,用于本文所述的本发明的袋可具有在约15cm至约30cm范围内的长度。举例而言,袋可具有在约18cm至约22cm范围内的长度。如图26中所示的袋162具有约20cm的长度。如本文所描述使用的收集袋可具有在约6.8cm至约8.8cm范围内的宽度。如图26中所示,收集袋162的宽度为约7.8cm。可在沿着导管的位置处使用包括但不限于无针阀的阀。举例而言,无针阀164位于距通过导管166耦接的袋162大约20cm处。在添加另一元件或组件之前,导管166自无针阀164延伸至少10cm。

[0634] 如图27A中所描绘,开放袋170在使用之前耦接于导管172、174、176。袋170可由可密封材料构筑。尤其地,袋可使用热封机(诸如台式热密封装置)密封。一些导管,例如导管174,可为非可熔接的。可在沿着导管的位置处使用包括但不限于无针阀的阀。举例而言,无针阀178定位于导管174、176的末端处。

[0635] 在一些实施例中,袋可具有在约10cm至约50cm范围内的长度。尤其地,用于本文所述的本发明的袋可具有在约15cm至约30cm范围内的长度。举例而言,袋可具有在约18cm至约22cm范围内的长度。如图27A中所示的袋170具有约20cm的长度。

[0636] 图27B示出了例如在材料沉积于袋内之后已经密封的收集袋的实施例的正视图。袋180由可密封材料构筑。尤其地,袋可使用热封机(诸如台式热密封装置)密封。密封口可接近于袋的开口边而定位,在一些情况下,标记可距开口边预定距离而定位。在一些实施例

中,密封口可实质上平行于开口边。

[0637] 一些导管,例如导管182、184、186可为可熔接的。可熔接导管可由例如聚氯乙烯(PVC)的聚合物材料制成。

[0638] 可在沿着导管的位置处使用包括但不限于无针阀的阀。举例而言,无针阀188定位于导管184、186的末端处。在一些实施例中,袋可具有在约10cm至约40cm范围内的长度。尤其地,用于本文所述的本发明的袋可具有在约15cm至约30cm范围内的长度。举例而言,袋可具有在约18cm至约22cm范围内的长度。如图27A中所示的袋180具有约20cm的长度。

[0639] 如图28中所示,冷藏保存试剂盒的实施例展示为面朝上且包括开放袋190及冷藏保存袋192。如所示,冷藏保存袋192可包括指示符193、194。冷藏保存袋可能需要适合于使用诸如二甲亚砜(“DMSO”)的冷藏保护剂的冷藏保存。在一些实施例中,冷藏保存袋可经构筑以使得袋可容纳在约5ml至约45ml范围内的材料体积。尤其地,冷藏保存袋可包括容纳在约10ml至约35ml范围内的材料体积。举例而言,一些实施例包括可容纳在约15ml至约30ml范围内的待储存材料体积的冷藏保存袋。冷藏保存袋192可具有使得达成所要预定体积的大小。在一些实施例中,冷藏保存袋可具有在约4cm至约11cm范围内的宽度及在约10cm至约18cm范围内的长度。举例而言,冷藏保存袋可具有在约5.8cm至约9.8cm范围内的宽度及在约12cm至约16cm范围内的长度。尤其地,如图28中所描绘的冷藏保存袋的一个实施例可具有约7.8cm的宽度及约14cm的长度。

[0640] 在使用之前,冷藏保存试剂盒和/或其特定组件可经灭菌。举例而言,袋190、192可经灭菌。用于形成袋190、192的材料可为可热密封的。在袋中使用的材料可包括但不限于聚合物,诸如EVA、聚酰胺(例如尼龙)及其组合。开放袋190可用于在使用密封口和/或夹具(未示出)封闭袋之后进行处理和/或解聚。

[0641] 试剂盒191进一步包括阀195、196、夹具197、198、导管199及过滤器200。过滤器200可为管线过滤器、血液过滤器(诸如血液施用过滤器)、生物过滤器和/或管线凝集物移除过滤器(in-line clump removal filter)。过滤器可经配置以从经处理组织移除大于预定大小的材料,从而形成所需材料。举例而言,组织的团块可使用过滤器与解聚组织分离。尤其地,在过滤之后进入导管的组织组合物可具有平均大小小于约200 μm 的组分,以使得形成所需材料。举例而言,所需材料可包括平均大小小于约170 μm 的肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)。

[0642] 过滤器可经选择以使得从导管进入的经处理组织组合物可富集,使得在过滤器之后,在稳定化组件方向上流入导管中的所需材料具有大小在约15 μm 至约500 μm 范围内的组分。在一些实施例中,过滤器可经配置以使得在过滤之后,在稳定化组件方向上进入导管的组织组合物具有大小在约50 μm 至约300 μm 范围内的组分。举例而言,在一个实施例中,过滤器可经配置以使得在过滤之后进入导管的组织组合物具有大小在约150 μm 至约200 μm 范围内的组分。

[0643] 在一些实施例中,富集组件的过滤器可从经处理的组织移除超出预定大小范围之外约5 μm 至约200 μm 的材料,以形成所需材料。举例而言,所需材料可包括平均大小在约5 μm 至约200 μm 的范围内的肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)。可将阀195、196置放在距收集袋预定距离处。举例而言,无针阀195可距收集袋190约20cm定位。诸如无针阀的阀可用以将材料添加至收集袋190。举例而言,可将酶培养基插入无针阀195中,以便添加培养基至收集袋190。

[0644] 在一些实施例中,在此类阀之后,可存在预定量的导管,以允许存在向冷藏保存试

剂盒熔接额外组件的空间。举例而言,在一些阀之后,至少十(10) cm的导管可定位于下一组件之前。导管199可为可密封和/或可熔接的。举例而言,用于导管的材料可包括但不限于聚氯乙烯(PVC)和/或本领域中已知的其他材料。在一些实施例中,导管可经设定大小以适配连接器。举例而言,导管可具有在约1.5mm至约4.5mm范围内的内径及在约2.1mm至约6.1mm范围内的外径。举例而言,冷藏保存试剂盒的实施例可包括内径在约2.9mm至约3.1mm范围内且外径在约4.0mm至约4.2mm范围内的导管。用于冷藏保存试剂盒191中的导管的长度可变化,其中各个导管组件的长度在约1cm至约30cm范围内。举例而言,如图28中所描绘,各个导管组件的长度可在约5cm至约20cm的范围内变化。

[0645] 如图28中所描绘的夹具197、198可用于阻止和/或防止酶培养基和/或经消化的组织移动至过滤器中。举例而言,夹具197可用于阻止和/或防止酶培养基和/或经消化的组织在所希望的过滤步骤之前移动至过滤器中。夹具198可阻止和/或防止冷藏保护剂不期望地移动至过滤器中。

[0646] 图29示出了与图28中所示的试剂盒191类似的冷藏保存试剂盒的实施例的俯视图,然而,试剂盒201面朝下。图29描绘收集袋202可封闭的位置。

[0647] 图30示出了包括封闭收集袋206及冷藏保存袋208的、面朝上的冷藏保存试剂盒的实施例的俯视图。在一些实施例中,冷藏保存袋208可包括端口215、216,其允许取样,准许将培养基和/或试剂无菌输入至冷藏保存袋中。冷藏保存试剂盒205可包括过滤器214、阀209、210、夹具211、212及导管222。

[0648] 过滤器214可为管线过滤器、生物过滤器、血液过滤器(诸如血液施用过滤器)和/或管线凝集物移除过滤器。过滤器可经配置以移除大于预定大小的材料。举例而言,可使用过滤器使组织的团块与解聚组织分离。过滤器可经选择以使得在过滤器之后进入导管的组织组合物可具有大小在约15 μ m至约500 μ m的范围内的组分。在一些实施例中,过滤器可经配置以使得在过滤之后进入导管的组织组合物具有大小在约50 μ m至约300 μ m的范围内的组分。举例而言,在一个实施例中,过滤器可经配置以使得在过滤之后进入导管的组织组合物具有平均大小在约150 μ m至约200 μ m范围内的组分。尤其地,在过滤之后进入导管的组织组合物可具有平均大小小于约170 μ m的组分。

[0649] 可将阀209、210置放在距收集袋预定距离处。举例而言,无针阀209可位于距收集袋206约20cm处。诸如无针阀的阀可用于将材料添加至收集袋206。举例而言,可将酶培养基插入无针阀209中,以便添加培养基至收集袋206。

[0650] 在一些实施例中,在此类阀之后,可存在预定量的导管,以允许存在向冷藏保存试剂盒熔接额外组件的空间。举例而言,在一些阀之后,至少十(10) cm的导管可定位于下一组件之前。导管222可为可密封和/或可熔接的。举例而言,用于导管的材料可包括但不限于PVC和/或本领域中已知的其他材料。在一些实施例中,导管可经设定大小以适配连接器。举例而言,导管可具有在约1.5mm至约4.5mm范围内的内径及在约2.1mm至约6.1mm范围内的外径。举例而言,冷藏保存试剂盒的实施例可包括内径在约2.9mm至约3.1mm范围内且外径在约4.0mm至约4.2mm范围内的导管。用于冷藏保存试剂盒205中的导管的长度可变化,其中个别导管组件的长度在约1cm至约30cm范围内。举例而言,如图30中所描绘,个别导管组件的长度可在约5cm至约20cm的范围内变化。

[0651] 如图30中所描绘的夹具211、212可用于阻止和/或防止酶培养基和/或经消化的组

织移动至过滤器中。举例而言,夹具211可用于阻止和/或防止培养基酶溶液和/或经消化的组织在所期望的过滤步骤之前移动至过滤器中。夹具212可阻止和/或防止冷藏保护剂不合期望地移动至过滤器中。

[0652] 图31示出了包括封闭收集袋226及冷藏保存袋228的、面朝上的冷藏保存试剂盒的实施例的侧视图。冷藏保存袋228可包括端口242。端口242提供对冷藏保存袋228的出入口。阀232、238及夹具234、236可安置于过滤器230周围且用以控制流体在冷藏保存试剂盒224内的移动。

[0653] 图32示出了冷藏保存试剂盒的实施例的端视图。密封袋226及过滤器230为可见的。密封袋226可使用导管、阀和/或夹具耦接于过滤器230。

[0654] 图33示出了收集袋的实施例的俯视图。袋232展示为开放的且包括指示符234、236及标记238、240。标记可用于显示袋子的哪些部分应该被密封和/或夹持。密封的标记可位于接近于袋的开口边处。此类标记可位于距开口边预定距离处。在一些实施例中,密封的标记可实质上平行于开口边。

[0655] 袋232包括定位器244及连接器246。连接器246将袋232与导管248耦接。连接器246可允许导管248分成包括夹具254、256和/或端口258、260的导管250、252。

[0656] 图34示出了包括收集袋264、夹具266、268、过滤器270、导管272、端口274、276、阀278、连接器280及冷藏保存袋282的冷藏保存试剂盒的实施例的正视图。收集袋及相关联导管可使用至少一些EVA材料形成。在一些实施例中,收集袋和/或导管可由EVA形成。夹具266、268可为弹簧夹。连接器280为四通连接器且可用于将来自过滤器270的导管耦接于阀278,例如无针阀,以及将导管耦接于冷藏保存袋282。

[0657] 图35示出了包括收集袋284、端口286、夹具288、296、阀290、292、过滤器298及冷藏保存袋294的冷藏保存试剂盒的实施例的正视图。如所描绘的,阀290、292可为能够在处理期间接收供用于试剂盒中的材料的无针阀。举例而言,将要经阀290、292提供的材料包括例如肿瘤消化培养基和/或冷藏保护剂或冷藏保存培养基,诸如二甲亚砜(“DMSO”)和/或其溶液,诸如55%DMSO及5%葡聚糖冷藏保存培养基(例如BloodStor55-5)。注射器300、302可用于分别经无针阀290、292提供肿瘤消化培养基及55%DMSO溶液,诸如55%DMSO及5%葡聚糖冷藏保存培养基。在处理期间,可在预定时间将材料选择性地提供至冷藏保存试剂盒。此外,夹具可用于控制诸如肿瘤消化培养基和/或冷藏保护剂的所提供材料的流动,诸如DMSO溶液可在预定时间提供至诸如收集袋、过滤器和/或冷藏保存袋的装置。

[0658] 图36A示出了能够紧固在诸如消化器的装置中的冷藏保存试剂盒的实施例的正视图。如所展示,收集袋304在使用期间至少部分地由支架306围封。支架可定位收集袋304以使得处理可以高效方式发生。图36A描绘收集袋304,其具有熔接口310,且在使用期间利用接近于熔接口310的夹具312以减小熔接口310上的压力。在使用期间引入的组织可实质上均匀分布于收集袋304中,使得组织可使用来自装置的桨叶314、316处理。冷藏保存袋330具有各自具有其自身端口334的多个区段332。

[0659] 图36B中描绘使用支架紧固的收集袋的实施例的侧视图。支架336可用于紧固收集袋。支架336包括铰链338、顶侧340、底侧342、夹具344、突起346及闩348。在使用期间,夹具344可位于接近收集袋上的熔接口处(图36A)。支架336上的突起346经构筑以使得其将位于接近收集袋的表面处,且在使用期间向上突起至收集袋中。在一些实施例中,突起346可减

少和/或阻止组织和/或培养基在使用期间的移动以确保组织的处理在沿着收集袋的长度上实质类似。举例而言,突起可经构筑以使得其减少和/或阻止组织在桨叶之间的滑动(展示于图36A中)。支架336亦可包括用以确保收集袋紧固的闩348。

[0660] 图36C示出了供与收集袋一起使用的、包括隆脊350的夹具344的分解视图。尤其地,在使用期间,夹具344可接近收集袋上的熔接口定位,以降低熔接口和/或密封口失效的风险。

[0661] 图37示出了包括收集袋354、过滤器356、阀362、364、夹具358、360、导管368及冷藏保存袋366的冷藏保存试剂盒的实施例的俯视图。冷藏保存试剂盒352的各种组件之间的导管长度可变化。

[0662] 图38示出了面朝下安置的、包括收集袋354、过滤器356、阀362、364、夹具358、360、导管368及冷藏保存袋366的冷藏保存试剂盒的实施例的视图。

[0663] 在一个特定实施例中,两个或更多个袋可耦接在一起以确保可恰当地储存解聚产物材料。

[0664] 在一些实施例中,本发明可包括用于半自动化无菌解聚、富集和/或稳定化来自组织(例如固体哺乳动物组织)的细胞和/或细胞聚集体的自动化装置。与本发明一起使用的自动化装置可包括可程序化处理器及冷藏保存试剂盒。在一些实施例中,冷藏保存试剂盒可为单次使用的无菌试剂盒。本发明进一步涉及半自动无菌组织处理方法。

[0665] 在一些实施例中,诸如收集袋的袋可用于收集试剂盒中。具有开口端的袋允许添加样品,诸如组织样品。在收集试剂盒中,连接器可将袋耦接于导管。导管材料可为可密封和/或可熔接的。举例而言,导管可使用能量(诸如热、射频等)密封。导管材料可由PVA制成。

[0666] 在一些实施例中,导管可与阀耦接以允许添加一种或多种培养基酶溶液,包括但不限于胶原蛋白酶、胰蛋白酶、脂肪酶、玻尿酸酶、脱氧核糖核酸酶、Liberase HI、胃蛋白酶或其混合物。举例而言,阀可为无针阀。

[0667] 用于冷藏保存试剂盒中的导管可包括外径在约3.0mm至约5.0mm范围内的导管,其中导管的内径在约2.0mm至约4mm范围内。尤其地,导管可具有 4.1 ± 0.1 mm的外径及 3.0 ± 0.1 mm的内径。导管的长度可视收集试剂盒的配置而定。举例而言,收集试剂盒的一个实施例可包括长度在约10cm至约20cm范围内的导管。

[0668] 在收集试剂盒原型的一些实施例中,可包括一个或多个夹具以阻止和/或防止组织和/或酶培养基移动。尤其地,可阻止酶培养基和/或组织在过滤步骤之前移动至过滤器中

[0669] 本发明通过以下编号段落进一步描述:

[0670] 1. 一种一次性无菌试剂盒,其包含:用于接收及处理包含固体哺乳动物组织的材料的解聚模块;用于过滤解聚的固体组织材料及分离未解聚组织及滤液的可选的富集模块;及用于可选地进一步处理和/或储存解聚的产物材料的稳定化模块,其中这些模块中的每一个包含一个或多个柔性容器,该一个或多个柔性容器通过经调适以使得组织材料能够在其间流动的一个或多个管道连接;及其中每个所述模块中包含一个或多个端口以准许将培养基和/或试剂无菌输入至一个或多个柔性容器中。

[0671] 2. 如段落1所述的一次性无菌试剂盒,其中一个或多个柔性容器包含弹性可变形材料。

[0672] 3.如段落1或2所述的一次性无菌试剂盒,其中解聚模块的一个或多个柔性容器包含一个或多个可密封开口。

[0673] 4.如段落3所述的一次性无菌试剂盒,其中解聚模块的柔性容器包含可热密封的熔接口。

[0674] 5.如任何前述段落所述的一次性无菌试剂盒,其中一个或多个柔性容器包含内部圆形边缘。

[0675] 6.如任何前述段落所述的一次性无菌试剂盒,其中解聚模块的一个或多个柔性容器包含经调适以机械地挤压及剪切其中的固体组织的解聚表面。

[0676] 7.如任何前述段落所述的一次性无菌试剂盒,其中富集模块的一个或多个柔性容器包含保留细胞化解聚固体组织的保留物的过滤器。

[0677] 8.如任何前述段落所述的一次性无菌试剂盒,其中稳定化模块的一个或多个柔性容器包含用于将活细胞储存为溶液形式或冷藏保存状态下的培养基制剂。

[0678] 9.如任何前述段落所述的一次性无菌试剂盒,其中试剂盒进一步包含数码、电子或电磁标签指示符。

[0679] 10.如段落9所述的一次性无菌试剂盒,其中标签指示符涉及一种特定程序,其定义:一种类型的解聚和/或富集和/或稳定化过程;在那些过程中使用的一种或多种类型的培养基;包括适合于受控速率冷冻的可选的冷冻溶液。

[0680] 11.如任何前述段落所述的一次性无菌试剂盒,其中相同的柔性容器可形成一个或多个解聚模块、稳定化模块及可选的富集模块的一部分。

[0681] 12.如任何前述段落所述的一次性无菌试剂盒,其中解聚模块包含用于接收待处理的组织的第一柔性容器。

[0682] 13.如任何前述段落所述的一次性无菌试剂盒,其中解聚模块包含第二柔性容器,其包含用于解聚的培养基。

[0683] 14.如任何前述段落所述的一次性无菌试剂盒,其中可选的富集模块包含第一柔性容器及用于接收富集的滤液的第三柔性容器。

[0684] 15.如任何前述段落所述的一次性无菌试剂盒,其中解聚模块及稳定化模块均包含第二柔性容器且其中所述第二容器包含消化培养基及稳定化培养基。

[0685] 16.如任何前述段落所述的一次性无菌试剂盒,其中稳定化模块包含第四柔性容器,其包含稳定化培养基。

[0686] 17.如任何前述段落所述的一次性无菌试剂盒,其中稳定化模块还包含用于储存和/或经历冷藏保存的第一柔性容器和/或第三柔性容器。

[0687] 18.根据任何前述段落所述的一次性无菌试剂盒在半自动化过程中的用途,其用于哺乳动物细胞或细胞聚集体的无菌解聚、稳定化及可选的富集。

[0688] 19.一种用于来自哺乳动物固体组织的细胞或细胞聚集体的半自动化无菌解聚和/或富集和/或稳定化的自动化装置,其包含:可程序化处理器;及如段落1至17中任一所述的一次性无菌试剂盒。

[0689] 20.如段落19所述的自动化装置,其进一步包含射频鉴别标签读取器,其用以识别一次性试剂盒。

[0690] 21.如段落19或20所述的自动化装置,其中可程序化处理器能够通过标签识别一

次性无菌试剂盒且随后执行定义解聚、富集及稳定化过程类型及那些过程所需的相应的培养基类型的试剂盒程序。

[0691] 22. 如任何前述段落所述的自动化装置,其中可程序化处理器经调适以与以下中的一个或多个通信且控制以下中的一个或多个:解聚模块;富集模块;及稳定化模块。

[0692] 23. 如段落22所述的自动化装置,其中可程序化处理器控制解聚模块以使得能够物理和/或生物分解固体组织材料。

[0693] 24. 如段落23所述的自动化装置,其中可程序化处理器控制解聚模块以使得能够物理及酶分解固体组织材料。

[0694] 25. 如段落24所述的自动化装置,其中固体组织材料的酶分解是通过一种或多种选自以下的培养基酶溶液:胶原蛋白酶、胰蛋白酶、脂肪酶、玻尿酸酶、脱氧核糖核酸酶、Liberase HI、胃蛋白酶或其混合物。

[0695] 26. 如段落19-25中的任意一项所述的自动化装置,其中可程序化处理器控制解聚柔性容器内的解聚表面,其机械地挤压及剪切固体组织,可选地,其中解聚表面为机械活塞。

[0696] 27. 如段落19-25中的任意一项所述的自动化装置,其中可程序化处理器控制稳定化模块以冷藏保存容器中的富集解聚固体组织,可选地使用可程序化温度。

[0697] 28. 如任何前述段落所述的自动化装置,其中装置进一步以任何组合包含以下额外组件中的一个或多个:传感器,其能够在将解聚的固体组织转移至可选的富集模块之前识别解聚过程是否已在解聚模块中完成;重量传感器,其测定解聚模块、富集模块和/或稳定化模块中的一个或多个的容器中所需的培养基的量,且控制材料在相应容器之间的转移;传感器,其控制一个或多个解聚模块的容器内的温度;富集模块;和/或稳定化模块;控制培养基在模块中的各容器的输入与输出端口之间的转移的至少一个气泡传感器;控制培养基在输入与输出端口之间的转移的至少一个泵,可选为蠕动泵;评估富集模块内的压力的压力传感器;控制富集模块内的切向流过滤过程的一个或多个阀;和/或控制培养基在各模块的输入与输出端口之间的转移的一个或多个夹具。

[0698] 29. 如任何前述段落所述的自动化装置,其中可程序化处理器经调适以维持稳定化模块中的最佳储存温度范围直至容器被移除;或执行受控冷冻步骤。

[0699] 30. 如任何前述段落所述的自动化装置,其进一步包含用户接口。

[0700] 31. 如段落23所述的自动化装置,其中接口包含用以显示指令的显示屏,这些指令指导用户输入参数、确认预程序化的步骤、警告错误或其组合。

[0701] 32. 如任何前述段落所述的自动化装置,其中自动化装置经调适成可移动的。

[0702] 33. 一种半自动无菌组织处理方法,其包含:从与无菌处理试剂盒相关的数码、电子或电磁标签指示符自动确定无菌解聚组织处理步骤及其相关条件,可选地根据段落1至17中任一所述的试剂盒;将组织样品置放于无菌处理试剂盒的解聚模块的柔性塑料容器中;及通过与以下通信且控制以下自动执行一个或多个组织处理步骤来处理组织样品:解聚模块;可选的富集模块;及稳定化模块。

[0703] 收集肿瘤材料、冷藏保存,及TIL制造的步骤

[0704] 用于TIL制造的起始材料为解聚及冷藏保存的细胞悬浮液,其含有来自合格患者的自体TIL及肿瘤细胞。提供用于收集及处理肿瘤起始材料的示例性流程图(图65)。

[0705] 以手术方式切除肿瘤,且随后对其进行修整以移除可见坏死组织、可见健康(非癌性)组织、脂肪组织及过量血液。经修整的肿瘤重量应大于或等于2克(≥2克)。重量超过7g的肿瘤可分成较小部分且单独地解聚。

[0706] 将各肿瘤片段放入含有培养基、胶原蛋白酶及DNA酶的单独无菌袋中。示例性试剂展示于下表中:

表 4 - 解聚培养基			
原材料	动物/人类来源	供货商	可用凭证
磷酸盐缓冲盐水	否	Life Technologies 有限公司	CoA
2 mM 氯化钙	否	Sigma-Aldrich	CoA
DNA 酶 1 (dornase α)	美国经批准的医学产品	Roche Products 有限公司	CoA
IV 型胶原蛋白酶	牛	Nordmark Arzneimittel 公司	CoA, CoO, TSE/BSE 声明
BloodStor 55-5 (55% DMSO)	否	BioLife Solutions	CoA

[0707] 随后对袋进行热密封,并解聚其内含物以产生含有肿瘤及TIL的均质细胞悬浮液。解聚是由装置,诸如本文所述的Tiss-U-Stor装置进行,该装置运行程序以在经定义的持续时间内使用经定义的压缩压力,递送经定义的数量重复物理压缩事件,以确保酶进入肿瘤组织,从而加速酶消化。记录单独的肿瘤的循环数目、压力、温度及持续时间。

[0708] 随后使用200μm过滤器 (Baxter,RMC2159) 无菌过滤均质化细胞悬浮液,且将滤液无菌传递至冷藏保存袋中。无菌添加BloodStor 55-5 (Biolife Solutions,Bothell,WA) 以达成5%DMSO。随后使用Tiss-U-Stor装置用经定义的冷却程序冷藏保存细胞悬浮液,且记录来源各肿瘤部分的各单独细胞悬浮液的测量的温度曲线。冷藏保存的细胞悬浮液储存于液氮的气相中。

[0709] 冷藏保存的细胞悬浮液建议储存条件为≤-130℃。

[0710] 细胞悬浮液封装于容器中,通过合格快递服务从临床地点运输至GMP细胞疗法制造地点,该容器经验证确保冷藏的细胞悬浮液维持在≤-130℃下。

[0711] (Tiss-u-Stor)

[0712] 评价切除的肿瘤的重量及状况。对于各肿瘤片段,移除额外材料且对片段进行称重。打开CS50N袋,添加高达约7g肿瘤且随后密封袋。通过注射器,经无针端口将15ml EDM消化培养基添加至具有2μl庆大霉素/两性霉素/ml EDM发袋中,随后将空气从袋移除至注射器中。

[0713] 将解聚袋中的肿瘤组织及解聚培养基置放于温度受控组织解聚器中。温度以1.5℃/min的速率从环境温度升高至35℃,且维持在35℃下总共约45分钟,在此期间解聚器在240次循环/分钟下活动。

[0714] 在解聚之后,肿瘤材料通过管线过滤器过滤至二级冷冻袋中。经无针端口注射1.5ml Blood stor (DMSO) 且移除空气。

[0715] 抽取2ml悬浮液用于测试。

[0716] 对于可选的冷藏保存,将低温袋装载至冷冻盒(freezing cassette)中且将冷冻盒置放在Via freeze中。随后将Via freeze冷却至-80℃,优选以-2℃/min的速率直接从35℃冷却至-80℃。

[0717] 随后将冷冻低温袋转移至液氮储存。

[0718] TIL制造

[0719] 用于在英国(UK)培养的自体组织应符合英国人类组织管理局(Human Tissue Authority)确立的HTA-GD-20,用于患者治疗的人类组织及细胞的质量及安全性保障指南(Guide to Quality and Safety Assurance for Human Tissue and Cells for Patient Treatment),并具有适合的同意书、身份链、监管链及筛选以确认供体为B型肝炎病毒、C型肝炎病毒、HIV-1及2、HTLV-1及2及梅毒阴性。

[0720] 制造涉及自含有来源于切除的肿瘤的TIL及肿瘤细胞的冷藏保存细胞悬浮液过度生长及扩增。若肿瘤大于约7g,则切除过程产生多个冷藏保存细胞悬浮液,其中各细胞悬浮液来源于2至7g肿瘤片段。通常,1次TIL过度生长仅需要将一个细胞悬浮液解冻,同时剩余的冷藏保存细胞悬浮液保持在GMP控制下且保持在建议储存条件(液氮的气相)下。

[0721] 在某些实施例中,细胞悬浮液已在解聚之后、在冷藏保存之前过滤。示例性制造程序展示于图66中。示例性制造原材料提供于下表中:

表 5 - 原材料来源			
原材料	人类/动物来源	供货商	可用凭证
T 细胞培养基	人类及动物	ThermoFisher Scientific	CoA, CoO
胎牛血清(FBS)	动物	Life Technologies	CoA, CoO
庆大霉素/ 两性霉素 B, 500×	否	Life Technologies	CoA
IL-2 (阿地白介素)	不可用	Clinigen	CoA
人类 AB 血清	人类	Valley Biomedical	CoA 以及 Origin
MACS GMP CD3 OKT3 抗体	否	Miltenyi Biotec	CoA
经照射的白血球层	人类	SNBTS	CoA
磷酸盐缓冲盐水	否	Life Technologies	CoA
白蛋白(人类) 20%	人类	OctaPharma	CoA 以及 Origin
CryoSure-DMSO	否	WAK-Chemie Medical 股份有限 公司	CoA, TSE

[0722] T细胞培养基(TCM)含有白蛋白(人类)、人类全息转铁蛋白(Holo Transferrin)及动物来源胆固醇。用于制造白蛋白及转铁蛋白的源血浆来源于美国且针对偶然性物质(adventitious agent)测试供体。

[0723] 胆固醇来源于源自澳大利亚/新西兰的绵羊羊毛脂,其符合禁止来自具有传染性海绵状脑病(TSE)的报导病例的国家的反刍原始材料的USDA规定。

[0724] 胎牛血清(FBS)来源于澳大利亚/新西兰,其符合禁止来自具有传染性海绵状脑病

(TSE)的报导病例的国家的反刍原始材料的USDA规定。FBS按照21CFR部分113.47测试,尤其地包括:蓝舌病病毒、牛腺病毒、牛细小病毒、牛呼吸道融合病毒、牛病毒性腹泻病毒、狂犬病病毒、呼肠孤病毒(reovirus)、细胞病变因子、血液吸附因子(haemadsorbing agent)。FBS在56℃下热灭活30分钟且0.1μm过滤三次以提供两个正交病毒移除步骤。

[0725] 人类AB血清来源于Valley Biomedical,一个FDA注册机构(1121958)。通过FDA批准的方法测试各供体单元的B型肝炎表面抗原(HBsAg)、B型肝炎病毒(HBV)核酸扩增测试(NAT)、1型及2型抗人类免疫缺陷病毒(HIV)、HIV-1NAT、抗C型肝炎病毒(HCV)、HCV NAT及梅毒测试。在56℃下热灭活血清30分钟且0.1μm过滤。

[0726] 经照射白血球层来源、制备、装运及储存:苏格兰国家输血服务中心(The Scottish National Blood Transfusion Service,SNBTS)筛选供体、收集血液组分、制备且照射白血球层。SNBTS由英国人类组织管理局(许可号11018)根据血液、安全性及质量规定(Blood,Safety and Quality Regulations)(2005)授权以取得、处理、测试、储存及分配血液、血液组分及组织。

[0727] 健康供体筛选满足或超出美国联邦法规(Code of Federal Regulations,CFR)标题21部分1271.75中所述的要求,不同之处在于供体生活在英国。虽然这提出了散发性克雅氏病(sporadic Creutzfeldt-Jakob Disease,sCJD)或变异型克雅氏病(variant Creutzfeldt-Jakob Disease,vCJD)的理论风险,但英国具有稳健的国家监视方案。最近的年度报导(涵盖1990年5月至2018年12月31日)(National CJD Research&Surveillance Unit,2018)证实了sCJD在英国的发病率与在世界上别处(包括无牛海绵状脑病(BSE)的国家)所观测到的相当。2017年至2020年4月5月没有报导vCJD病例,且从2012年1月1日开始全国仅识别出两个病例(NCJDRSU Monthly Report,2020)。从2007年开始无报导的情况下,这个严格检测的网络已排除输血传染的vCJD感染(National CJD Research&Surveillance Unit,2018)。示例性合格供体测试(表7)满足21CFR部分1271.85要求且添加了不需要的E型肝炎测试。

表 6 - 示例性供体筛检 (NHSBT)

病原体	说明	要求
B 型肝炎、C 型肝炎及 E 型肝炎病毒	未检测到/阴性	每次供给
1 型及 2 型人类免疫缺陷病毒 (HIV)	未检测到/阴性	每次供给
梅毒	未检测到/阴性	每次供给
1 型和 2 型人类 T 淋巴细胞病毒 (HTLV)	未检测到/阴性	第 1 次供给及选定后续供给
疟疾	未检测到/阴性	根据供体的个体情况进行测试
克氏锥虫 (<i>T. cruzi</i>)	未检测到/阴性或 IgG 阳性	
西尼罗河病毒 (West Nile virus)	未检测到/阴性	
巨细胞病毒 (CMV)	未检测到/阴性或 IgG 阳性	

[0728] 授权血液机构制备适合于治疗患有重度嗜中性白血球缺乏症的患者的临床级经照射的白血球层。为了制备白血球层,将血液离心以形成三层:红血球层、白血球层及血浆层。用25至50Gy辐照照射来自10个供体的白血球层,以遏制细胞生长。制备临床级经照射的白血球层,并使用包括温度监测器的受控温度运送器由过夜快递运送至GMP制造设施。运送在制造过程中使用前一天发生。

[0729] 在接收后,白血球层保持在15至30℃下直至在制造中使用。

[0730] 经照射的饲养细胞制备

[0731] 混合来自多达十个独特供体的白血球层,随后通过Ficoll梯度密度离心进行离心,以收集外周血单个核细胞(PBMC)。在封闭静态细胞培养袋中,将大约 4×10^9 个活白血球再悬浮于TCM中,该TCM补充有大约8%人类AB血清,3000IU/mL IL-2及30ng OKT-3。根据规范释放PBMC。

表 7 - 同种异体 PBMC 储备液规格

特性	测试方法	允收标准
外观	目视检查	ID 标签
属性	流式细胞术	$\geq 85\%$ 活 CD45+细胞
存活率	流式细胞术	报导结果
总活白血球含量	流式细胞术	2 至 4×10^9

[0732] 还测试PBMC的无菌性及支原体。在开始步骤3(第12天,图C)之前,移除经配方的饲养细胞的样品,其包括培养基、IL-2及OKT3。在第13天、第17天及第18天培育且分析此样品以确认饲养细胞未扩增。

[0733] 白蛋白(人类),亦称为人类血清白蛋白(HSA),来源于美国供体。所有血浆供给被单独测试,且对HBsAg、抗HIV 1、抗HIV 2及抗HCV抗体无反应。各血浆池通过NAT测试,并发现对HBsAg、抗HIV 1、抗HIV 2及HCV-RNA呈阴性。根据满足美国及欧洲药典的生产及测试标准的GMP规定制造HSA产物。

[0734] TIL过度生长

[0735] 细胞悬浮液以大约 0.25×10^6 至 0.75×10^6 个活细胞/毫升接种至TCM,且在标准细胞培养条件(37°C , $5\%\text{CO}_2$)中培养;该TCM补充有 $10\%\text{FBS}$ 、 $0.25\mu\text{g/mL}$ 两性霉素B以及 $10\mu\text{g/mL}$ 庆大霉素(Life Technologies, Grand Island, NY)及 3000IU/mL 的白介素-2(IL-2;阿地白介素)(Clinigen, Nürnberg, Germany)。

[0736] 在第5天,移除一半培养基且用补充有 $10\%\text{FBS}$ 、 $0.50\mu\text{g/mL}$ 两性霉素B、 $20\mu\text{g/mL}$ 庆大霉素及 6000IU/mL 的IL-2的TCM更换。

[0737] 在第7天,若细胞浓度 $>1.5 \times 10^6$ 个活细胞/毫升,则将TIL过度生长培养物以三倍体积稀释以维持大约 0.1×10^6 至 2.0×10^6 个活细胞/毫升。若细胞浓度 $\leq 1.5 \times 10^6$ 个活细胞/毫升,则更换一半培养基。在任一选项中,培养基为补充有 $10\%\text{FBS}$ 、 $0.50\mu\text{g/mL}$ 两性霉素B、 $20\mu\text{g/mL}$ 庆大霉素及 6000IU/mL 的IL-2的TCM。

[0738] 在第10天,若细胞浓度 $>1.5 \times 10^6$ 个活细胞/毫升,则将TIL过度生长培养物以三倍体积稀释以维持大约 0.1×10^6 至 2.0×10^6 个活细胞/毫升。若细胞浓度 $\leq 1.5 \times 10^6$ 个活细胞/毫升,则更换一半培养基。在任一选项中,添加的培养基为补充有 $10\%\text{FBS}$ 、 $0.50\mu\text{g/mL}$ 两性霉素B、 $20\mu\text{g/mL}$ 庆大霉素及 6000IU/mL 的IL-2的TCM。

[0739] TIL活化

[0740] 使用抗CD3抗体(OKT3),以当结合于来自同种异体外周血单个核细胞(PBMC)的经照射饲养细胞的FC受体时提供CD3特异性刺激,来活化TIL。饲养细胞提供额外共刺激的天然来源以支持所添加的抗CD3(OKT-3)。

[0741] 在第12天,使用大约 $30 \pm 10\text{ng/mL}$ 的OKT3、大约 8% 人类AB血清及 $3000 \pm 1000\text{IU/mL}$ 的IL-2将来自TIL过度生长步骤2的 1 至 20×10^6 个活T细胞添加至 2.0 至 4.0×10^9 个活经照射饲养细胞(部分8.1.4.4)。将TIL活化培养物在标准细胞培养条件下培育6天。

[0742] TIL扩增

[0743] 在第18天,活化TIL通过将活化TIL细胞悬浮液无菌添加至含有补充有大约 8% 人类AB血清及 3000IU/mL 的IL-2的T细胞培养基的生物反应器中来继续扩增。

[0744] 在第19天,向TIL扩增提供补充有 3000IU/mL IL-2的T细胞培养基的连续进料,直至收集。

[0745] 通过使用SEFIATM洗涤细胞来收集TIL。通过离心浓缩细胞,随后使用补充有 1% 人类血清白蛋白(HSA)的磷酸盐缓冲盐水(PBS)洗涤2至4次。细胞随后再悬浮于PBS+ $1\%\text{HSA}$ 中至大约 50mL 至 60mL 。

[0746] 将经洗涤及浓缩的细胞无菌转移至低温袋中,且移除一部分用于批次放行测试及样品保留。添加冷藏保护剂以获得悬浮于大约 $10\%\text{DMSO}$ 及 $8.5\%\text{HAS}$ 的PBS溶液的 $\geq 5 \times 10^9$ 个活细胞的配方产物。移除一部分以用于批次放行测试及样品保留。将低温袋冷却至 -80°C 。

[0747] TIL制造过程

[0748] 下表展示工艺变化形式的实例。

表 8 - 制造工艺				
工艺版本	v1.0	v1.1	v1.2	ITIL-168
肿瘤解聚	人工解聚	人工解聚	Tiss-U-Stor 解聚	Tiss-U-Stor 解聚
起始材料	新鲜	冷藏保存	冷藏保存	冷藏保存
TIL 过度生长	1-3 周	1-3 周	12 天	12 天
中间保持步骤	冷藏保存	冷藏保存	不适用	不适用
TIL 回收	3 天	3 天	不适用	不适用
快速扩增阶段	12 天	12 天	12 天	12 天
培养延长	0-2 天	0-2 天	不适用	不适用
最终产物	新鲜	新鲜	冷藏保存	冷藏保存

[0749] 下表展示药物产品资料

表 8 - 药物产品资料				
产物批次	工艺版本	产量 ($\times 10^{10}$)	存活率	CD3+细胞百分比
TIL001	1.0	1.1	82	N/A
TIL003	1.0	2.2	94	98
TIL005	1.0	2.0	96	N/A
TIL012	1.0	3.2	95	98
TIL013	1.0	2.1	80	92
TIL014	1.0	4.4	91	95

TIL015	1.0	6.4	91	97
TIL016	1.0	5.5	93	96
TIL027	1.0	3.8	95	97
TIL032	1.0	3.7	92	99
TIL035	1.0	6.4	96	90
TIL037	1.0	2.6	92	97
TIL038	1.0	1.3	83	98
TIL039	1.1	1.2	80	93
TIL040	1.0	5.3	93	97
TIL041	1.0	3.2	93	98
TIL043	1.0	4.8	93	98
TIL054	1.1	0.82	86	91
TIL065	1.1	3.4	94	97
TIL067	1.2	3.0	91	97
TIL073	1.0	5.4	92	98
TIL077	1.2	1.0	91	97
TIL078	1.2	3.4	99	98
E2	1.2	3.5	86	97
E3	1.2	1.8	80	96
E4	1.2	1.0	88	93
E5	1.2	4.1	98	100

[0750] 比较冷藏保存的与新鲜的细胞悬浮液,代表性产率为恒定的,如通过类似原料药产率(图67A)、存活率(图67B)及T细胞百分比(图67C)所表明。

[0751] 冷藏保存的优化-作为肿瘤材料的替代物,分离的PBMC使用Tiss-U-Stor过程及材料消化。在一系列条件下评价商业冷藏保存试剂(CPA)以确定何种试剂最大化解冻后存活率(图68)。两种CPA、Cryostor10及Stem Cell Banker无DMSO的解冻后存活率类似。随后,将基于CryoStor的DMSO与Bloodstor 55-5(一种基于DMSO的冷藏保存剂)比较,且选择更高浓度的BloodStor产物,因为其更加浓缩,因此允许较小低温袋。随后遵循将材料维持在4℃下10分钟,随后以-1℃/min的速率降低温度或直接以-2℃/min的速率自35℃降低至-80℃的方案对冷藏保存进行比较。所使用的两个冷藏保存方案之间的解冻后存活率类似(图69)。

[0752] 在冷却期间,冰成核释放热量。过度冷却(一种所释放的热量似乎使溶液升温的现象)与较低解冻后回收率相关。在使用两种方案冷藏保存期间,从测试物品记录温度数据(图70)。在两个独立运作的、使用-1℃/min的方案中观测到过度冷却,而-2℃/min冷却方案一次过度冷却事件也没有纪录,且在第二独立运作中,观测到的过度冷却事件相对于替代

方案释放较少热量(图70)。

[0753] 冷藏保存的DP转移至气相LN₂以用于在 $\leq -130^{\circ}\text{C}$ 下储存及运输。

[0754] 测试样品无菌性,且将所保持的样品在 -80°C 下使用Coolcell® (Biocision, Larkspur, CA) 冷冻,随后转移至气相LN₂以用于储存目的。

[0755] 尽管已详细地描述本发明及其优势,但应理解,在不脱离如所附权利要求中所定义的本发明的精神及范畴的情况下,可在本文中进行各种改变、替代及更改。

[0756] 尽管已详细地描述本发明及其优势,但应理解,在不脱离如所附权利要求中所定义的本发明的精神及范畴的情况下,可在本文中进行各种改变、替代及更改。

[0757] 本发明将进一步在以下实施例中进行说明,这些实施例仅出于说明的目的而给出且不意欲以任何方式限制本发明。

实施例

实施例1

[0758] 图39展示在使用期间袋400的实施例。如所描绘,在诸如托盘406的装置404内,袋400由诸如夹具402的紧固组件紧固。组织408通过袋400的透明侧面可见。导管410耦接于袋400。

实施例2

[0759] 图40描绘用于如本文所描述的本发明的袋420的实施例。如所描绘,袋420通过紧固组件422自装置及托盘424紧固。组织材料424通过袋420的透明侧面可见。导管426耦接于袋420。如所示,使用固定组件428(尤其为胶带)进一步紧固托盘406内的袋400的位置。组织424通过袋420的透明侧面可见。如图40中所示,袋可包括端口430以靠近袋和/或组织424的内部。

实施例3-解聚及冷藏保存

[0760] TIL075系由转移性肿瘤块(样品)制成。将肿瘤样品称重且如下处理。 $S1=1.4\text{g}$ 。 $S1$ 通过自动化程序解聚。 $S2=19.4\text{g}$ 。分开 $S2$,一个部分(约 7.7g)通过自动化程序解聚且第二部分(约 12g)人工解聚。

[0761] 人工解聚:将肿瘤样品切割成较小的 2 至 4mm^3 块且添加至含有抗生素的 80ml 消化培养基的瓶子中。将瓶子置于振荡器上且在 37°C 下解聚过夜(约 14 小时)。消化物随后经由netwells及 $100\mu\text{M}$ 细胞过滤器过滤至Falcon50管中。保留 10% 的过滤的消化物用于无菌性测试。将剩余部分离心且再悬浮于 12ml CS10中且分成 12 个冷冻小瓶。

[0762] Tiss-U-Stor解聚:用无菌剪刀打开两个CS50N袋,剪切无端口的末端。将 $S1$ 1.4gm 样品及 $S2$ 的 7.7gm 部分置放于CS50N袋中,且将袋密封。将 15ml 解聚培养基与 $30\mu\text{l}$ 抗生素合并并且使用注射器经袋的无针端口添加至每一个密封袋中。将袋转移至装载在ViaFreeze中的组织解聚器,且开始解聚方案。解聚方案需要在 $1.5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 的速率下自环境温度提高至 35°C ,且温度保持在 35°C 下,同时解聚器活动。解聚器速率设定成 240 个循环/分钟。随后ViaFreeze的温度保持在 35°C ,直至冷藏保存步骤。

[0763] 袋设置包括通过导管经管线过滤器直接连接至二级低温袋。将CS50袋中的解聚材料过滤至低温袋中且密封导管连接件。经低温袋的无针端口缓慢添加 1.5ml Blood-stor (DMSO),将袋置放于经设计用于最佳热传递的卡匣中,且将卡匣置放回ViaFreeze中代替解聚器。

[0764] 进行解聚后冷藏保存方案。冷冻循环将ViaFreeze温度以 $-2^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 自 35°C 逐渐变化至 -80°C 。将冷冻袋转移至液氮储存中。

实施例4-解聚及冷藏保存

[0765] TIL077由转移性黑色素瘤肿瘤块(样品)制成。将肿瘤样品称重且如下处理。 $S1=4.6\text{g}$ 。 $S2=4.6\text{g}$ 。

[0766] Tiss-U-Stor解聚:用无菌剪刀打开两个CS50N袋,剪切无端口的末端。将 $S1=4.6\text{gm}$ 样品及 $S2=4.6\text{gm}$ 样品置放于CS50N袋中,且将袋密封。将15ml解聚培养基与30 μl 抗生素合并,并使用注射器经袋的无针端口添加至每一个密封袋中。将袋转移至装载在ViaFreeze中的组织解聚器,且开始解聚方案。解聚方案需要在 $1.5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 的速率下自环境温度提高至 35°C ,且温度保持在 35°C 下,同时解聚器活动。解聚器速率设定成240个循环/分钟。随后ViaFreeze的温度保持在 35°C ,直至冷藏保存步骤。图71示出解聚纪录。

[0767] 袋设置包括通过导管,经管线过滤器直接连接至二级低温袋。将CS50袋中的解聚材料过滤至低温袋中且密封导管连接件。经低温袋的无针端口,缓慢添加1.5ml Blood-stor (DMSO),将袋置放于经设计用于最佳热传递的卡匣中,且将卡匣置放回ViaFreeze中代替解聚器。

[0768] 进行解聚后冷藏保存方案。冷冻循环将ViaFreeze温度以 $-2^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 从 35°C 逐渐变化至 -80°C 。图71展示冷藏保存纪录。将冷冻袋转移至液氮储存中。

实施例5-解聚及冷藏保存

[0769] TIL078由转移性黑色素瘤肿瘤块(样品)制成。将肿瘤样品称重且如下处理。 $S1=11\text{g}$ 。 $S2=2\text{g}$ 。

[0770] Tiss-U-Stor解聚:用无菌剪刀打开两个CS50N袋,剪切无端口的末端。分开肿瘤材料且将6.4gm样品置放于两个CS50N袋中的每一个中,并对袋进行密封。将15ml解聚培养基与30 μl 抗生素合并,并使用注射器经袋的无针端口添加至密封袋中的每一个中。将袋转移至装载在ViaFreeze中的组织解聚器,且开始解聚方案。解聚方案需要在 $1.5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 的速率下从环境温度提高至 35°C ,且温度保持在 35°C 下,同时解聚器活动。解聚器速率设定成240个循环/分钟。随后ViaFreeze的温度保持在 35°C ,直至冷藏保存步骤。图72展示冷藏保存纪录。

[0771] 袋设置包括通过导管经管线过滤器直接连接至二级低温袋。将CS50袋中的解聚材料过滤至低温袋中且密封导管连接件。经低温袋的无针端口缓慢添加1.5ml Blood-stor (DMSO),将袋置放于经设计用于最佳热传递的卡匣中,且将卡匣置放回ViaFreeze中代替解聚器。

[0772] 进行解聚后冷藏保存方案。冷冻循环将ViaFreeze温度以 $-2^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 从 35°C 逐渐变化至 -80°C 。图72展示冷藏保存纪录。将冷冻袋转移至液氮储存中。

实施例6-解聚及冷藏保存

[0773] TIL081由转移性黑色素瘤肿瘤块(样品)制成。更新软件以在单一方案中包括解聚及冷藏保存。图73展示解聚及冷藏保存纪录。如同之前的实施例,解聚器活动约53分钟。(图73A、73B)。解聚组织从解聚袋经过滤器转移至低温袋中,且返回至ViaFreeze以在距解聚过程开始约90分钟(此时开始低温冷却)内进行冷藏保存。

实施例7-自小瓶制造

表 9-细胞冷藏保存及解冻

试剂/材料		
试剂	制造商	目录号
视细胞类型而定的培养基	NA	NA
DPBS	Sigma	D8537-500ML
15 mL 离心管	VWR	339650
血清学移液管 (Stripette) 10mL	Corning	CLS4101
血清学移液管 25 mL	Corning	CLS4251
血清学移液管 5 mL	Corning	CLS4051
过滤管头 1000 μ L (Tips 1000 μ L filtered)	StarLabs	S1182-1730
锥虫蓝 (Trypan Blue)	Sigma	T8154-100ML

表 10-设备

描述	制造商	部件编号	序列号/资产号
Powerpette pro 1-100 mL	VWR	452-8344	NA
移液管 ErgoOne 100-1000 μ L	Star Labs	S7110-1000	NA
Megafuge 40R Centrifuge	Hereus	75004518	41536283
血球计	Hawksley	HC002	NA
水浴 12 L	VWR	462-0557	BP1912001
IncuSafe CO ₂ 培育器	PHCBI	MCO-170AIC-PE	NA

[0774] 自液氮移出冷冻小瓶且置于37℃水浴中,直至细胞悬浮液刚好熔融。将细胞悬浮液置放于15mL falcon管中且用PBS注满至10mL,并以400g离心10分钟。倒出上清液。

[0775] 对于细胞培养,使细胞集结粒再悬浮于预温热培养基中,最初以小体积(即2至3mL)。根据下表,将黏附细胞系(即肿瘤株,HEK 293)添加至具有培养基的组织烧瓶中。以0.5至 1×10^6 个细胞/毫升的密度涂铺非黏附细胞系(即T细胞、TIL、Jurkat细胞)。将烧瓶置放于潮湿的37℃培育器中且每2至3天更换培养基。

表 11-不同容器中的黏附细胞的细胞接种密度

容器/烧瓶类型	接种密度	培养基体积 mL
24 孔	0.1×10^6	0.5 至 1
6 孔	0.5×10^6	2 至 4
T 25	0.7×10^6	4 至 6
T 75	2.1×10^6	12 至 15
T 150	4.4×10^6	25 至 30

实施例8-由经冷藏保存的解聚的肿瘤制造。

[0776] 制造过程

[0777] 解冻起始材料

[0778] VIAThaw CB1000解冻系统用于控制储存于冷冻袋中的冷藏保存的样品的加热。将冷藏保存的细胞悬浮液解冻,随后稀释于由Life Technologies (Paisley, 英国) 制造的T细胞培养基 (TCM) 中。TCM含有80% 洛希维·帕克纪念研究所 (Rosewill Park Memorial Institute, RPMI) 1640培养基及20% AIM V。细胞悬浮液经70至100 μ m过滤器过滤且离心,且移除上清液。使细胞集结粒再悬浮于补充有10% 经照射胎牛血清 (FBS) 的TCM (Life Technologies, Auckland, 新西兰) 中。

[0779] 将Origin CS50袋中的解聚、冷藏保存的肿瘤 (约16.5ml) 置放于VIAThaw CB1000解冻系统的解冻托盘中且升温至约0℃。

实施例9-效能

[0780] 通过基于共培养的效能方法,对被表达OKT3的目标细胞活化的T细胞的百分比进行定量。活体内的TIL产物作用机制涉及通过pMHC-HLA呈现TIL肽,其在活体内结合于TCR。效能分析定量有效T细胞的百分比,定义为当通过与表达OCT3抗原结合域的K562细胞共培养来特异性活化时,CD137、IFN- γ 、TNF α 或CD107a阳性的活T细胞除以总活T细胞。用于定量T细胞效能的标记物包括DRAQ7、CD45、CD2、CD107a、CD137、TNF- α 及IFN- γ 。

[0781] 为测量效能,ITIL-168DS细胞使用以下3种细胞系中的1种共培养大约5小时:条件1-无刺激-背景细胞活性;条件2-K562细胞系-背景TCR-独立反应性;条件3-针对OKT-3表达ScFv的K562细胞系-TCR诱导的T细胞刺激。

[0782] 通过流式细胞术分析所培养细胞且在活白血球上闸控以定量表达4种活化标记物中的至少1种的T细胞。为了稳定性测试,将冷藏保存的DP细胞解冻、洗涤且静置过夜。

[0783] ITIL-168TCR效能如下计算:步骤1) 归因于非特异性刺激的效能%获自条件2;步骤2) 归因于CD3特异性及非特异性刺激的效能%获自条件3;步骤3) 归因于CD3特异性刺激的效能%计算为条件3-条件2。

[0784] 对于条件2及条件3,效能%为100%减去CD137-/IFN- γ -/TNF α -/CD107a- (即背景) 的所有T细胞的百分比。此群体不产生至少一种标记物。

实施例10-TIL过度生长及快速扩增

[0785] TIL制造过程在肿瘤切除、解聚、冷藏保存及可选的包装及装运之后开始。在受控条件下在合格运送器中运送包装,及自肿瘤处理中心运送至Instil的制造设施。冷藏保存

的肿瘤及T细胞使用受控条件解冻,且稀释于由补充有10%FBS、两性霉素B、庆大霉素、万古霉素及IL-2的80%洛斯维·帕克纪念研究所(RPMI) 1640培养基及20%AIM V构成的T细胞培养基(TCM)(本文中称为ICMT)中。

[0786] 通过在封闭袋中离心来洗涤细胞,再悬浮于ICMT中且获取样品以细胞计数。以 0.25×10^6 个活细胞/毫升为目标将细胞悬浮液接种至具有ICMT的培养袋中,且在受控条件下培育直至工艺的第八天。在第八天,获取用于细胞计数的样品且将等体积的ICMT添加至培养袋,并在受控条件下培育。在第十一天,获取细胞计数且将等体积的ICMT添加至培养袋,并在受控条件下培育。在第十三天,获得细胞计数,且通过在袋中离心来浓缩TIL以提供 1×10^6 至 20×10^6 个活T细胞。

[0787] 也在第十三天,使用抗CD3及经照射饲养细胞(同种异体PBMC)以及含有8%人类AB血清及IL-2的TCM(本文中称为WTCM)活化 1×10^6 至 20×10^6 个活过度生长TIL。在静态培养袋中,在受控条件下培育TIL活化培养物至多6天。在培育第十九天,进行细胞计数且将活化TIL接种于含有WTCM的生物反应器中。细胞在受控条件下培育至多6天。在第二十天,向TIL扩增提供补充有IL-2的TCM的连续进料,直至收集目标剂量在工艺的第十七天之前或当天达成。

[0788] 一旦达成收集剂量,对细胞进行计数,洗涤且通过在补充有1%人类血清白蛋白(HSA)的磷酸盐缓冲盐水(PBS)中离心来浓缩。药品(DP)袋中的TIL随后冷却至2至8℃,且用含有16%HSA及20%DMSO的冷藏保护剂1:1制剂,得到含有8.5%HSA及10%DMSO的PBS中的DP最终制剂。移出样品体积以用于批次放行测试、参考及备份样品。

[0789] 使用预定义程序将配方的DP冷藏保存在CRF中,直至产物达到指定温度。冷藏保存的DP随后转移至液氮储存,随后在 $\leq -130^\circ\text{C}$ 下运输至临床以用于施用。

表 12-设备

设备/供应产品	制造商	型号或目录号
Leukosep ficoll 管	Greiner Bio-One Lrd	227288
PermaLife 细胞培养袋, 325 ml	Origen Biomeical 公司	PL325-2G
细胞培养扩增袋	Charter Medical 有限公司	EXP-1L
WAVE 10L 袋	Cytiva	29-1084-43
CT800.1 Sefia 试剂盒	Cytiva	20001

表 13-试剂				
试剂	制造商	目录号	批次号	过期日期
T 细胞培养基	Life Technologies	04196658P	2021537	2020 年 8 月 31 日
γ 照射的 FBS	Life Technologies	01190005H-RESE RVE 2-2YBT2DS	2225231RP	2024 年 5 月 31 日
普留净 (Proleukin) 制造商小瓶 (IL-2)	Clinigen Group PLC	普留净	801313T	2020 年 12 月 31 日
等分 II-2 储备液	N/A	N/A	CTU-IL2/02 /09/2019	2020 年 8 月 31 日
庆大霉素/两性霉素溶液 (500 $\times$)	Life Technologies	R01510	2217613	2021 年 3 月 30 日
万古霉素制造商小瓶	Bowmed Ibisqus	N/A	90260	2021 年 2 月 28 日

万古霉素等 分试样 (50 mg/ml)	N/A	N/A	CTU-12-06- 2020	2021 年 2 月 28 日
γ 照射的人类 AB 血清	Gemini Bio-Products 责任有限公 司	100-812G	H12Y00K	2020 年 9 月 30 日
OKT-3 制造 商小瓶 (1 g/ml)	Miltenyi Biotec 有限公 司	170-076-116	6200108211	2020 年 10 月 17 日
等分 OKT-3	N/A	N/A	CYU-OKT3/ 05/05/2020	2020 年 10 月 17 日
20%人类血 清白蛋白	Nova Biologics 公 司	68982-0633-02	M848B6661	2021 年 11 月 27 日
CryoSure DMSO	WAK-Chemie Medical 股份 有限公司	WAK-DMSO-50	USP8C1S	2022 年 2 月 28 日

实施例11

[0790] 在GMP条件下进行全规模运作。这些运作中所用的ITIL-168工艺包括使用冷藏保存的肿瘤消化物、TIL过度生长阶段(阶段1)的 0.25×10^6 个活细胞/毫升接种目标、从TIL过度生长至TIL快速扩增阶段(REP)的连续处理及最终产物的自动化调配及最终药品的冷藏保存。

[0791] ITIL-168为用于治疗已从至少一种之前的疗法线复发或难以用至少一种之前的疗法线治疗的、患有晚期黑色素瘤的成人患者的肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)疗法。ITIL-168由从患者癌症组织中分离和体外扩增的自体T细胞的单次输注组成,并通过静脉内给药。工艺改良已经随着时间推移予以鉴别及实施,改良工艺被称作ITIL-168。表概述工艺变化形式及实施。

表 14-制造过程发展的概述

工艺步骤	单元操作/变化	MS v1.0	MS v1.1	UTIL-01	ITIL-168 工艺
肿瘤消化物制备	肿瘤解聚	人工解聚于瓶子中	人工解聚于瓶子中	在袋中自动化解聚(使用 Tiss-U-Stor 装置)	在袋中自动化解聚(使用 Tiss-U-Stor 装置)
	肿瘤消化物配方	非冷藏保存	非冷藏保存	冷藏保存	冷藏保存
TIL 过度生长	用于肿瘤消化物的培养容器	盘中的开放工艺	盘中的开放工艺	盘中的开放工艺	袋中的封闭工艺
	接种密度	1×10^6 个活细胞/毫升的目标	1×10^6 个活细胞/毫升的目标	0.5×10^6 个活细胞/毫升的目标	0.25×10^6 个活细胞/毫升的目标
	细胞计数测试方法	血球计	流式细胞术	流式细胞术	流式细胞术
	材料	健大霉素及两性霉素 B	健大霉素及两性霉素 B	健大霉素及两性霉素 B	健大霉素、两性霉素 B 及万古霉素
	材料	热灭活, 且 $0.1 \mu\text{m}$ 过滤的 FBS	热灭活, 且 $0.1 \mu\text{m}$ 过滤的 FBS	热灭活, 且 $0.1 \mu\text{m}$ 过滤的 FBS	热灭活, 且 $0.1 \mu\text{m}$ 过滤的、经照射的 FBS
TIL REP	材料	热灭活, 且 $0.1 \mu\text{m}$ 过滤的人类 AB 供体	热灭活, 且 $0.1 \mu\text{m}$ 过滤的人类 AB 供体	热灭活, 且 $0.1 \mu\text{m}$ 过滤的人类 AB 供体	热灭活, 且 $0.1 \mu\text{m}$ 过滤的、经照射的人类 AB 供体
TIL 过度生长至 REP	TIL 过度生长后, 冷藏、解冻/洗涤及回收	冷藏保存保持步骤及解冻 1-3 天后回收	冷藏保存保持步骤及解冻 1-3 天后回收	在无冷藏保存下连续处理	在无冷藏保存下连续处理
收集至药品配方	药品	Haemonetics Cell Saver 5 (人工配方至 270 mL)	Haemonetics Cell Saver 5 (人工配方至 270 mL)	Haemonetics Cell Saver 5 (人工配方至 270 mL)	Cytiva Sefia S-2000 (自动化配方至 110 mL)
药品调配	药品	非冷藏保存	非冷藏保存	冷藏保存	冷藏保存

[0792] 用于两个工艺发展运作中的 ITIL-168 制造过程的概述展示于表 15 中。两个工艺发展运作 (标记为运作 1 (TIL065) 及运作 2 (Biopartners9251)) 分别在 GMP 条件下以全规模进行, 且使用从患者收集的过量肿瘤及来源于供货商 Biopartners 的肿瘤。

[0793] 在这些两个工艺发展运作期间, 不进行针对生物负荷及最终产物的无菌性、内毒

素、支原体及外观测试的工艺内测试,因为这些运作主要意在评价在工艺改良之后的制造过程效能及产物质量,以及在工艺验证运作之前在GMP条件下作为制造操作员的训练运作。

表15-ITIL-168制造过程的工艺流程图

工艺步骤	日	单元操作	工艺控制	描述
接收及放行		冷藏保存的肿瘤消化物接收、检查及放行		冷藏保存的肿瘤消化物的接收、检查及放行
TIL 过度生长		↓		
	1	冷藏保存肿瘤消化物解冻及洗涤		在补充有 FBS、IL-2 及抗微生物试剂的培养基中的肿瘤消化物的解冻、洗涤及稀释
		↓		
	1	TIL 过度生长接种	→ 细胞计数	在补充有 FBS、IL-2 及抗微生物试剂的培养基中, 在一个或多个培养袋中接种经洗涤的细胞
		↓		
	1	TIL 过度生长培育		在补充有 FBS、IL-2 及抗微生物试剂的培养基中, 在一个或多个培养袋中培育经洗涤的细胞至多 12 天
		↓		
	8	TIL 过度生长培养基添加	→ 细胞计数	TIL 在补充有 FBS、IL-2 及抗微生物试剂的培养基中持续扩增
		↓		
	11	TIL 过度生长培养基添加	→ 细胞计数	TIL 在补充有 FBS、IL-2 及抗微生物试剂的培养基中持续扩增
		↓		
	13	TIL 过度生长浓缩	→ 细胞计数	通过在袋中离心的 TIL 浓缩

表15-ITIL-168制造过程的工艺流程图



[0794] TIL过度生长及REP使用表12及表13中所示的材料,如实施例10中进行。

[0795] 对于两个运作(运作1及运作2),根据批次制造纪录(BMR),对于TIL过度生长阶段或阶段1在第1天、第8天、第11天及第13天,及对于TIL快速扩增阶段(REP)或阶段2在第13天、第19天、第22天及第25天量测总CD3+细胞计数。图76A及76B分别展示在TIL过度生长阶段(阶段1)及TIL REP阶段(阶段2)中两个运作的总CD3+细胞计数。图76B中所示的数据表明,对于两个运作,REP阶段结束时实现 $>1 \times 10^{10}$ 个CD3+细胞,得到符合 5×10^9 至 5×10^{10} 个CD3+细胞的剂量允收标准的两个批次。

[0796] 还在第1、8、11、13和25的两个运作中测量了存活率(活CD3+细胞的百分比)。图76C示出了在制造过程期间及REP阶段即将结束时提高的存活率,且两个运作均满足 $>70\%$ 的最终产物标准。

[0797] 针对两个运作,从细胞计数数据计算快速扩增阶段(REP)的扩增倍数。另外,还评价两个工艺发展运作的最终产物质量属性,诸如剂量、存活率、效能、T细胞表型及T细胞子集。

[0798] 表16中所呈现的数据表明,在工艺改良之后,ITIL-168制造过程类似于历史工艺进行,且产生符合规格要求的最终产物质量属性。

表 16 - ITIL-168 制造过程效能及产物质量属性

运作	REP 期间的扩增倍数 (绝对)	剂量 (总活 CD3+细胞)	存活率 (%)	效能 ¹ (%)
允收标准/规格要求	NA	5×10^9 至 5×10^{10}	≥ 70	≥ 40
观测到的历史范围	395 – 7526 (n = 22)	7.90×10^9 至 6.25×10^{10} (n=23)	80 – 99 (n = 23)	所测试的工艺中的历史保留
运作 1	1350	3×10^{10}	90	63.2
运作 2	1700	2×10^{10}	88	65.2
¹ 效能计算为对 CD137、CD107a、TNF- α 及 IFN- γ 中的一个或多个呈阳性的所有活 CD2+细胞的出现频率				

实施例12-施用

[0799] 疗法

[0800] 对象接受环磷酰胺及氟达拉滨(fludarabine)的淋巴细胞枯竭化学疗法方案。疗法经设计以降低诸如调节T细胞的抑制细胞的影响且增加促淋巴细胞生长细胞因子(例如 IL-7及IL-15)的表达。在淋巴细胞枯竭化学疗法之前及期间开始水合方案。抗微生物及抗真菌预防在开始淋巴细胞枯竭化学疗法之前开始。评估及管理发热及嗜中性白血球缺乏症。在淋巴细胞枯竭化学疗法之前开始非类固醇止吐疗法(non-steroidal anti-emetic therapy)且视需要继续。

[0801] 淋巴细胞枯竭化学疗法如下施用。环磷酰胺及氟达拉滨施用的剂量基于在基线就诊时获取的体重评估来计算。在肥胖对象(体重指数>35)中,使用实际体重。环磷酰胺的剂量基于体重,且氟达拉滨的剂量基于体表面积。剂量可以根据剂量范围的实践向上或向下取整。下表示出了建议剂量、施用途径、输注体积及持续时间:

表 17-淋巴细胞枯竭化学疗法方案

天	药物	剂量	途径	施用
-7	氟达拉滨	25 mg/m ²	IV	于 10-100ml 0.9% NaCl 中, 经大约 30 分钟
	环磷酰胺	60 mg/kg	IV	于 500ml 0.9% NaCl 中, 经大约 1 小时
-6	氟达拉滨	25 mg/m ²	IV	于 10-100ml 0.9% NaCl 中, 经大约 30 分钟
	环磷酰胺	60 mg/kg	IV	于 500ml 0.9% NaCl 中, 经大约 1 小时
-5	氟达拉滨	25 mg/m ²	IV	于 10-100ml 0.9% NaCl 中, 经大约 30 分钟
-4	氟达拉滨	25 mg/m ²	IV	于 10-100ml 0.9% NaCl 中, 经大约 30 分钟
-3	氟达拉滨	25 mg/m ²	IV	于 10-100ml 0.9% NaCl 中, 经大约 30 分钟
-2	停药日			
-1	停药日			

表 18-氟达拉滨剂量调节

肌酐清除率 (通过 Cockcroft-Gault 公式测量)	氟达拉滨剂量
≥ 70 mL/min	25 mg/m ²
51-69 mL/min	20 mg/m ²

[0802] 在TIL输注之前,向对象用抗组织胺及乙酰胺苯酚前驱给药。输注袋的内含物使用非白血球耗乏过滤器(例如≥170微米的管线/导管过滤器)输注。对象接受至多8次剂量的静脉内IL-2用于输注后支持。在完成TIL输注后施用IL-2,第0天开始且继续至第4天。

实施例13-治疗结果

[0803] 总计44名患有转移性皮肤黑色素瘤的患者经历肿瘤切除术及开始TIL过度生长制造(阶段1)。在这些44名患者中,42名单独患者批次完成阶段1,其中2个失败尝试。三十一名患者继续进行REP制造(阶段2)。一个批次的TIL过度生长阶段1制造失败,且实施经修订的阶段1制造过程,其实现了成功阶段2制造。随后治疗患者。出于以下原因,不选择剩余12个批次来开始REP:8名归因于患者状态之间发临床恶化,从而使其不适合TIL疗法;2名患者由于其它疗法的临床改良而不再需要TIL;1名患者不能确保治疗的资金;且1名由于所切除样本上缺乏肿瘤组织而制造失败。四名患者制造成功,然而,认为这些患者对于TIL疗法临床上不适合且因此未治疗。

[0804] 在44个切除的肿瘤中,2个制造失败,获得95%制造成功率。用利用标准制造过程制得的TIL产物治疗二十七名患者。在TIL制造完成时,认为这些患者中的6名对于完全治疗方案临床上不适合且接受明显较低剂量的调节化学疗法及输注后IL-2,且因此从分析中排

除。一名患者进行肿瘤切除,其不满足起始标准TIL过度生长制造步骤(阶段1)的标准。因此,起始经修改阶段1,其确实能够实现快速扩增方案(阶段2)及最终产物调配,尽管处于极低最终细胞剂量(1.7×10^9)下。因此产物使用经修改的制造过程产生且产生低细胞剂量,所以其不视为代表MS许可工艺,且因此临床资料从分析排除。

[0805] 收集且分析剩余21名患者的人口统计数据、基线患者特征、治疗细节及处置以及临床功效及安全性结果。截至分析截止日期,这些患者具有距离TIL输注日期52.2个月(范围:4.6、98.8个月)的中位数可能随访时间。

[0806] 在这些21名患者中,大部分(71%)为男性,且TIL治疗时的中位数年龄为45岁(范围:16、68)。在基线,所有患者均患有IV期转移性皮肤黑色素瘤,中位数为自从原始诊断为黑色素瘤的39个月(范围:8、177)。大部分(67%)患者在超过3个疾病部位处报导病变,包括7名(33%)在TIL治疗时记录有脑转移。先前全身性疗法的中位数数目为2个(范围:1、9)。百分之五十二(52%)的患者具有BRAF突变,他们所有人在存在或不存在MEK抑制剂的情况下已接受BRAF抑制剂且经历BRAF抑制剂下的进展。除两名患者以外的所有患者(90%)已接受至少一种先前检查点抑制剂,其中12名(57%)已接受PD-1抑制剂(纳武单抗(nivolumab)或派立珠单抗(pembrolizumab))。另外,8名(38%)接受按顺序给与的伊匹木单抗(ipilimumab)及纳武单抗或派立珠单抗,且4名(19%)同时接受伊匹木单抗及纳武单抗。在切除的肿瘤用于TIL产生之前,20名(95%)患有复发性或难治性进行性黑色素瘤,且1名(5%)由于不耐受性而在TIL疗法之前停止治疗。

[0807] 在接受TIL之前,10名(48%)患者具有升高的血清乳糖脱氢酶(LDH)含量,其中7名(33%)在正常范围上限(ULN)的1与2倍之间且3名(14%)高于ULN的2倍。20名患者可获得以目标病灶的病灶尺寸总和(SLD)衡量的基线肿瘤负荷;中位数基线SLD为100mm(范围:13, 281)。

TIL治疗

[0808] 所有21名患者在TIL输注之前接受2次剂量的环磷酰胺及5次剂量的氟达拉滨作为调节化学疗法。输注的TIL细胞的中位数总数目为 31.9×10^9 (范围: 7.9×10^9 , 62.5×10^9)。IL-2剂量的中位数总数目为8(范围:4, 11)。患者留院持续中位数10天(范围:7、15)。三名(14%)患者在治疗阶段期间收住入ICU。

[0809] 报导在TIL治疗阶段期间临床上显著的AE。在调节化学疗法阶段期间报导的常见AE($\geq 10\%$)包括嗜中性白血球缺乏症(43%)及恶心(19%),且大体上与这些化学疗法剂的副作用概况一致。

[0810] TIL输注后发作的常见AE包括血小板减少症(62%)、发热(57%)、寒战(rigors)(43%)、心动过速(29%)、嗜中性白血球缺乏症(29%)、肺水肿(24%)、血管渗漏(24%)、皮疹(19%)、心房颤动(14%)、心血管不稳定(14%)、胸腔感染(14%)及水肿(14%)(表19)。这些AE与其它TIL试验(Dafni等人,2019;Rohaan等人,2018)中报导的AE一致。

[0811] 制造过程阶段1失败但用由经修改的制造过程产生的产物治疗的患者在TIL疗法后第6天死亡,这归因于由肾衰竭、流体过载及可能的败血症加剧的大规模肿瘤负荷。

表19.TIL输注后发作的AE(所有经治疗对象)

AE 术语-n (%)	所有经治疗对象 (N=21)
血小板减少症	13 (61.9)
发热	12 (57.1)
寒战	9 (42.9)
嗜中性白血球缺乏症	6 (28.6)
心搏过速	6 (28.6)
肺水肿	5 (23.8)
血管渗漏	5 (23.8)
皮疹	4 (19.0)
心房颤动	3 (14.3)
心血管不稳定	3 (14.3)
胸腔感染	3 (14.3)
水肿	3 (14.3)
混乱	2 (9.5)
低血钾症	2 (9.5)
低血压	2 (9.5)
神经缺陷	2 (9.5)
肾损伤	2 (9.5)

呼吸道败血症	2 (9.5)
癫痫	2 (9.5)
败血症	2 (9.5)
白斑病	2 (9.5)
体重增加	2 (9.5)
喘鸣	2 (9.5)
咳嗽	1 (4.8)
腹泻	1 (4.8)
语言障碍	1 (4.8)
植入综合征	1 (4.8)
幻觉	1 (4.8)
嗜睡	1 (4.8)
PICC 管感染	1 (4.8)
胸腔积液	1 (4.8)
感染性肺炎 (pneumonia)	1 (4.8)
非感染性肺炎 (pneumonitis)	1 (4.8)
呼吸问题	1 (4.8)
呼吸急促	1 (4.8)

[0812] 在治疗阶段期间量测外周血计数。在开始调节化学疗法时观测到嗜中性白血球、血小板、淋巴细胞、白血球计数及血红素减少的趋势。血球计数及血红素含量一般在TIL输注之后1至4天达到其最低点。通常在TIL输注日期之后大约7天观测到血液计数恢复至基线水平。

[0813] 实施了制造过程中的近期变化,以改良稳固性并实现利用集中式制造的多中心临床试验。在此更新中,将消化的肿瘤材料冷藏保存以延长稳定性。重要的是,在用预先冷藏保存下制得的产物治疗的四名患者中,所观测到的AE概况与在系列中治疗的其他患者(表20)且与在其它TIL产物的临床试验中报导的AE概况大体上一致。

表20.TIL输注后发作的AE(用Cryo-in产物治疗的对象)

AE 项-n (%)	所有经治疗对象 (N=4)
血小板减少症	4 (100)
发热	2 (50.0)
皮疹	2 (50.0)
寒战	2 (50.0)
低血压	1 (25.0)
肾损伤	1 (25.0)
血管渗漏	1 (25.0)
白斑病	1 (25.0)

[0814] 21名患者中有十五名通过包括目标病变的放射学测量的连续CT和/或MRI扫描进行疾病评估。在这些患者当中,定量反应率(不需要反应确认)为53%,包括2名(13%)达成CR的患者及6名(40%)达成PR的患者(表21)。

表21.最佳总体反应的概述(功效可评价分析集)

功效可评价分析集 (N=15)	
最佳总体反应	
完全反应 (CR)	2 (13.3)
95% CI (Clopper-Pearson 方法)	1.7, 40.5
部分反应 (PR)	6 (40.0)
95% CI (Clopper-Pearson 方法)	16.3, 67.7
稳定疾病 (SD)	3 (20.0)
95% CI (Clopper-Pearson 方法)	4.3, 48.1
进行性疾病 (PD)	4 (26.7)
95% CI (Clopper-Pearson 方法)	7.8, 55.1
反应率 (CR+PR)	8 (53.3)
95% CI (Clopper-Pearson 方法)	26.6, 78.7
疾病控制率 (CR+PR+SD)	11 (73.3)
95% CI (Clopper-Pearson 方法)	44.9, 92.2

[0815] 基于定量及定性反应两者的、包括所有患者的反应率为57%,包括3名(14%)达成

CR的患者及9名(43%)达成PR的患者。两名额外患者已对BRAF抑制剂达拉非尼(dabrafenib)产生抗性且在转为TIL治疗之前正在经历疗法下的疾病进展。在TIL疗法之前停达拉非尼,且在TIL之后大约1至2周重新开始,以预防通常伴随达拉非尼中断的快速肿瘤生长。这些2名患者中的每一个在TIL之后达成定性反应(1名持久CR及1名PR)。两名患者随后在TIL之后停止达拉非尼。因为这些患者均患有达拉非尼难以治疗的疾病,因此可以合理地得出结论,其在TIL之后经历的临床益处归因于TIL而非达拉非尼的暂时恢复。因此,对反应进行敏感性分析,包括这些患者作为反应者。在此敏感性分析中,反应率为14/21(67%),其中4名(19%)完全反应者及10名(48%)部分反应者(表22)。

表22-最佳总体反应、敏感性分析的概述(所有经治疗对象)

所有经治疗对象 (N=21)	
最佳总体反应	
完全反应 (CR)	4 (19.0)
95% CI (Clopper-Pearson 方法)	5.4, 41.9
部分反应 (PR)	10 (47.6)
95% CI (Clopper-Pearson 方法)	25.7, 70.2
稳定疾病 (SD)	4 (19.0)
95% CI (Clopper-Pearson 方法)	5.4, 41.9
进行性疾病 (PD)	3 (14.3)
95% CI (Clopper-Pearson 方法)	3.0, 36.3
反应率 (CR+PR)	14 (66.7)
95% CI (Clopper-Pearson 方法)	43.0, 85.4
疾病控制率 (CR+PR+SD)	18 (85.7)
95% CI (Clopper-Pearson 方法)	63.7, 97.0

[0816] 在重要的基线和疾病特征方面,各亚组的反应通常是一致的;所述的重要的基线和疾病特征包括年龄、疾病部位数目、先前疗法线数目、先前BRAF抑制剂、先前PD-1抑制剂、基线脑转移及基线肿瘤负荷。值得注意地,在用最类似于ITIL-168的制造过程治疗的4名患者中,总体反应率(75%)及CR率(25%)与更广群体一致。在具有基于CT和/或MRI扫描的定量反应的15名患者中,14名具有详细肿瘤测量值且相对于基线肿瘤减小的最大百分比呈现于瀑布图中(图74)。一名患者具有PD的最佳总体反应,但并未报导任何治疗后目标病变测量值(通过观测新病变测定的进展),且因此未在图中呈现。

[0817] 根据定量反应数据(N=15)的无进展存活期(PFS)中位数时间为6.7个月,其中4名患者具有持续反应(2个CR及2个PR),在分析截止时无任何后续疗法。基于定量及定性反应

数据 (N=21) 的中位数PFS时间为6.7个月,其中5名对象具有持续反应 (3个CR及2个PR) 而无任何后续疗法。所有21名治疗患者的中位数总存活 (OS) 时间为21.3个月 (图75A)。具有定量反应数据的15名患者的中位数OS时间为16个月 (图75B)。然而,未获得反应者 (仅根据定量反应,N=8) 的中位数OS时间,而无反应者 (N=7) 的中位数OS时间为6.5个月 (图75C)。

实施例14-经遗传修饰的TIL

表 23-试剂及设备

试剂	制造商	目录号
15 mL 聚丙烯离心管	Appleton Woods	AB031
50 mL 聚丙烯离心管	Appleton Woods	AB028
Dulbecco 磷酸盐缓冲液	Sigma-Aldrich	D8537-24X500ML
胎牛血清 (热灭活)	Sigma-Aldrich	F9665-500ML
TCM-CT4834/GIBCO CUSTOM P158718	Gibco	
青霉素-链霉素	Sigma-Aldrich	P0781-100ML
TC 6 孔盘	StarLab	CC7682-7506
无菌 1.5 mL Eppendorf 管	StarLab	S1615-5510
非 TC 平底 96 孔盘	Falcon	353072
96 孔 U 底盘	Falcon	351177
FACS 管	SLS	352063
TC 24 孔盘	StarLab	CC7682-7524
用于悬浮培养物的微量盘, 96 孔, F 底	Grenier, Bio-One	655185
T 细胞 TransACT (TM), 人类	Miltenyi	130-111-160
庆大霉素两性霉素	Invitrogen (ThermoFisher Scientific)	10184583
普留净 (Aldesleukin) IL-2	Novartis	PL-00101/0936
Heraeus Megafuge 40R, 冷藏离心	Thermo Scientific	75004518
IncuSafe CO2 培育器	PHCBI	MCO-170AIC-PE
NovoCyte 3005 流式细胞仪系统 (CE-IVD)	Agilent Technologies	2010064D
NovoExpress 软件	Agilent Technologies	

[0818] 从液氮储存移出肿瘤消化物冷冻小瓶且在37℃水浴中解冻,直至细胞悬浮液刚好熔融(D1)。将细胞悬浮液移出至15mL falcon管,用PBS注满至10mL,以400g离心5分钟且倾倒上清液。

[0819] 将细胞集结粒再悬浮于预温热的适当T细胞培养基中,且使用锥虫蓝进行细胞计数以测定存活率。以 1×10^6 个细胞/毫升的密度再悬浮细胞。

[0820] 将待未活化培养的细胞以 0.5×10^6 个细胞/毫升再悬浮,且将2mL (1×10^6 个细胞)置放于具有IL-2 (3000IU/mL) 的24孔组织培养盘的孔中。细胞在潮湿的37℃培育器中培养直至转导,所述转导为每2至3天添加IL-2 (3000IU/mL)。

[0821] 对于待在D3及D4转导的细胞,细胞活化发生在D1。对于将在D7及D8转导的细胞,细胞活化发生在D5。

[0822] 对于TIL活化,将 0.5×10^6 个细胞/毫升置于具有3000IU/mL IL-2的24孔组织培养盘中。每 1×10^6 个细胞的TIL悬浮液添加10 μ L T细胞TransACT (TM) (1:1比率) 且将细胞在37℃培育器中培育48小时。

[0823] 转导第一天(D3或D7)

[0824] 从24孔盘收集细胞至15mL falcon管中,用10mL TCM注满且以400g旋转5分钟。使用锥虫蓝计数细胞且以 1×10^6 个细胞/毫升再悬浮。

[0825] 在各转导方法中,在96孔平底盘中使用 1×10^5 个细胞(100 μ L)/孔。若在24孔盘中转导,则置放 1×10^6 个细胞/孔(500 μ L)。若在6孔盘中转导,则置放 5×10^6 个细胞/孔(2mL)。

[0826] 通过再悬浮于TCM中至100 μ L/ 10^5 个细胞/条件的最终值(或24孔及6孔盘的适当密度及体积),制备慢病毒(MOI5) 及IL-2 (3000IU/mL) 的主混合物。制备用于孔数目+1的主混合物体积以解决移液损失。

[0827] 对于NT细胞(MOCK),在96孔平底盘中制备TCM及IL-2 (3000IU/mL) /100 μ L的主混合物。对于24孔和6孔板,分别用IL-2 (3000IU/mL) 将MOCK T细胞再悬浮在500 μ L和2mL中。

[0828] 从Eppendorf或15mL falcon管中的细胞移除上清液,取决于条件,每 1×10^5 个细胞在适当的100 μ L主混合物中再悬浮细胞(或24孔及6孔盘的适当密度及体积)。

[0829] 相应地,各条件适当地再悬浮且转移细胞至非TC平底96孔、24孔或6孔盘上。

[0830] 在96孔盘转导中添加200 μ L PBS至周围孔以防止蒸发。

[0831] 细胞在潮湿的37℃培育器中培育过夜。

[0832] 转导第二天(D4或D8)

[0833] 通过从96孔平底盘上下再悬浮且转移至96孔U底盘来收集细胞。(从24孔或6孔盘的收集在15mL falcon管中进行。) 以400g旋转盘5分钟且用TCM洗涤细胞。

[0834] 对于各转导方法,使用 1×10^5 个细胞(100 μ L) /96孔平底盘孔。若在24孔盘中转导,则置放 1×10^6 个细胞/孔(500 μ L)。若在6孔盘中转导,则置放 5×10^6 个细胞/孔(2mL)。

[0835] 通过再悬浮于TCM中至100 μ L/ 10^5 个细胞/条件的最终值(或24孔及6孔盘的适当密度及体积),制备慢病毒(MOI5) 及IL-2 (3000IU/mL) 的主混合物。制备用于孔数目+1的主混合物体积以解决移液损失。

[0836] 对于NT细胞(MOCK),对于96孔平底盘制备TCM及IL-2 (3000IU/mL) /100 μ L的主混合物。对于24孔及6孔盘,分别用IL-2 (3000IU/mL) 将MOCK T细胞再悬浮于500 μ L及2mL中。

[0837] 从Eppendorf或法falcon中的细胞移除上清液,取决于条件,每 1×10^5 个细胞在适

当的100 μ L主混合物中再悬浮细胞(或24孔及6孔盘的适当密度及体积)。

[0838] 相应地,各条件适当地再悬浮且转移细胞至非TC平底96孔、24孔或6孔盘上。在96孔盘转导中添加200 μ L PBS至周围孔以防止蒸发。细胞在潮湿的37 $^{\circ}$ C培育器中培育过夜。

[0839] 次日,将细胞转移至新96孔圆底盘、24孔或6孔盘中的具有IL-2 (3000IU/mL) 的新鲜培养基中,且在潮湿的37 $^{\circ}$ C培育器中培育72小时。

[0840] 96孔盘的最终体积为200 μ L/孔;24孔盘的最终体积为2mL/孔;6孔盘的最终体积为5mL/孔。每2至3天添加IL-2 (3000IU/mL)。

[0841] 细胞在D8上针对D3+D4转导和在D12上针对D7+D8转导的转导效率进行染色。

[0842] TIL过度生长

[0843] Mock及转导的细胞维持在96孔U底盘中直至将其置于REP中。

[0844] 对于细胞维持,每2至3天一半培养基经移除且被新鲜TCM及IL-2 (3000IU/mL) 替换。对于96孔盘,移除且替换100 μ L培养基至200 μ L的最终体积。对于24孔盘,移除且替换1mL培养基至2mL的最终体积。对于6孔盘,移除且替换1mL培养基至2mL的最终体积。

[0845] REP开始于D13 (过度生长12天)。

[0846] 本发明通过以下编号段落进一步描述:

[0847] 1.一种分离冷藏保存的、未经修饰的肿瘤浸润淋巴细胞(UTIL)的治疗性群体的方法,其包含:(a) 无菌解聚自对象切除的肿瘤,从而产生经解聚的肿瘤,其中肿瘤充分解聚,使得细胞悬浮液可冷藏保存;(b) 与步骤(a)同一天通过冷却或维持在低温下冷藏保存经解聚的肿瘤;(c) 可选地,储存冷藏保存的经解聚的肿瘤;(d) 通过在包含IL-2的细胞培养基中培养经解聚的肿瘤来进行第一扩增,以产生UTIL的第一群体;(e) 通过与额外的IL-2、OKT-3及抗原呈递细胞(APC)一起培养UTIL的第一群体来进行第二扩增,以产生TIL的第二群体;及(f) 收集和/或冷藏保存UTIL的第二群体。

[0848] 2.如段落1所述的方法,其中解聚包含物理解聚、酶解聚或物理及酶解聚。

[0849] 3.如段落1或2所述的方法,其中冷却以受控速率进行。

[0850] 4.如段落3所述的方法,其中受控速率冷冻为约-2 $^{\circ}$ C/min至约-60 $^{\circ}$ C。

[0851] 5.如段落1-5中任一所述的方法,其中经解聚的肿瘤经细胞化。

[0852] 6.如段落1-5中任一所述的方法,其中经解聚的肿瘤经纯化。

[0853] 7.如段落1-6中任一所述的方法,其中在步骤(a)之后提供单细胞悬浮液。

[0854] 8.如段落1-7中任一所述的方法,其中UTIL的第一群体为约100万至2000万个UTIL。

[0855] 9.如段落1-8中任一所述的方法,其中步骤(d)进一步包含从肿瘤起始材料生长出UTIL随后在步骤(e)中快速扩增。

[0856] 10.如段落9所述的方法,其中步骤(d)进行约两周且步骤(e)进行约两周。

[0857] 11.如段落1-10中任一所述的方法,其中步骤(d)和/或步骤(e)进一步包含添加IL-7、IL-12、IL-15、IL-18、IL-21或其组合。

[0858] 12.如段落1-11中任一所述的方法,其进一步包含步骤(g) 悬浮UTIL的第二群体。

[0859] 13.如段落12所述的方法,其中悬浮是在缓冲盐水、人类血清白蛋白及二甲亚砜(DMSO)中。

[0860] 14.如段落1-13中任一所述的方法,其中步骤(f)为冷藏保存且进一步包含解冻

UTIL的最终步骤。

[0861] 15.如段落14所述的方法,其中解冻的UTIL准备以单次剂量形式输注而无进一步修饰。

[0862] 16.一种通过如段落1至15中任一所述的方法获得的冷藏保存的、未经修饰的肿瘤浸润淋巴细胞(UTIL)的治疗性群体。

[0863] 17.如段落16所述的治疗性群体,其中群体包含约 5×10^9 个至 5×10^{10} 个T细胞。

[0864] 18.一种如段落16或17所述的治疗性群体的冷藏保存袋。

[0865] 19.如段落18所述的冷藏保存袋,其用于静脉输液。

[0866] 20.一种治疗癌症的方法,其包含施用如段落14或15所述的治疗性群体或如段落18或19所述的冷藏保存袋。

[0867] 21.如段落20所述的方法,其中所述癌症为膀胱癌、乳腺癌、由人乳头瘤病毒引起的癌症、子宫颈癌、头颈癌(包括头颈部鳞状细胞癌(HNSCC)、肺癌、黑色素瘤、卵巢癌、非小细胞肺癌(NSCLC)、肾癌或肾细胞癌。

[0868] 本发明通过以下编号段落进一步描述:

[0869] 1.一种分离冷藏保存的、未经修饰的肿瘤浸润淋巴细胞(UTIL)的治疗性群体的方法,其包含:(a)从对象切除肿瘤;(b)将切除的肿瘤储存于一次性无菌试剂盒中,其中无菌试剂盒包含:用于接收及处理包含固体哺乳动物组织的材料的解聚模块;用于过滤解聚的固体组织材料及分离未解聚组织及滤液的、可选的富集模块;及用于可选地进一步处理和/或储存解聚的产物材料的稳定化模块,其中模块中的每一个包含一个或多个柔性容器,该一个或多个柔性容器通过一个或多个管道连接,所述管道经调适以使得组织材料能够在其间流动;及其中模块中的每一个包含一个或多个端口以准许将培养基和/或试剂无菌输入至一个或多个柔性容器中;(c)在解聚模块中无菌解聚切除的肿瘤,从而产生经解聚的肿瘤,其中若切除的肿瘤可在无细胞损伤下冷藏保存,则充分解聚;(d)在稳定化模块中冷藏保存经解聚的肿瘤;(e)通过在包含IL-2的细胞培养基中培养经解聚的肿瘤来进行第一扩增,以产生UTIL的第一群体;(f)通过与额外的IL-2、OKT-3及抗原呈递细胞(APC)一起培养UTIL的第一群体来进行第二扩增,以产生TIL的第二群体;(g)收集和/或冷藏保存UTIL的第二群体。在一些实施例中,步骤a)为可选的。

[0870] 2.如段落1所述的方法,其中解聚包含物理解聚、酶解聚或物理及酶解聚。

[0871] 3.如段落1或2所述的方法,其中经解聚的肿瘤经细胞化。

[0872] 4.如段落1-3中任一所述的方法,其中在步骤(c)之后提供单细胞悬浮液。

[0873] 5.如段落1-4中任一所述的方法,其中UTIL的第一群体为约100万至2000万个UTIL。

[0874] 6.如段落1-5中任一所述的方法,其中步骤(e)进一步包含从切除的肿瘤起始材料生长出UTIL,随后进行步骤(f)的快速扩增。

[0875] 7.如段落6所述的方法,其中步骤(e)进行约两周且步骤(f)进行约两周。

[0876] 8.如段落1-7中任一所述的方法,其中步骤(e)和/或步骤(f)进一步包含添加IL-7、IL-12、IL-15、IL-18、IL-21或其组合。

[0877] 9.如段落1-7中任一所述的方法,其进一步包含步骤(h)悬浮UTIL的第二群体。

[0878] 10.如段落9所述的方法,其中悬浮为在缓冲盐水、人类血清白蛋白及二甲亚砜

(DMSO) 中。

[0879] 11. 如段落1-9中任一所述的方法, 其中步骤(g) 为冷藏保存且进一步包含解冻UTIL的最终步骤。

[0880] 12. 如段落10所述的方法, 其中解冻的UTIL可作为单次剂量形式输注, 而无需进一步修饰。

[0881] 13. 一种通过如段落1至11中任一所述的方法获得的冷藏保存的UTIL的治疗性群体。

[0882] 14. 如段落13所述的治疗性群体, 其中群体包含约 5×10^9 个至 5×10^{10} 个T细胞。

[0883] 15. 一种如段落13或14所述的治疗性群体的冷藏保存袋。

[0884] 16. 如段落15所述的冷藏保存袋, 其用于静脉输液。

[0885] 17. 一种治疗癌症所述的方法, 其包含施用如段落13或14所述的治疗性群体或如段落15或16所述的冷藏保存袋。

[0886] 18. 如段落17所述的方法, 其中该癌症为膀胱癌、乳腺癌、由人乳头瘤病毒引起的癌症、子宫颈癌、头颈癌(包括头颈部鳞状细胞癌[HNSCC])、肺癌、黑色素瘤、卵巢癌、非小细胞肺癌(NSCLC)、肾癌或肾细胞癌。

[0887] 19. 如段落1所述的方法, 其中无菌试剂盒的一个或多个柔性容器包含弹性可变形材料。

[0888] 20. 如段落1所述的方法, 其中无菌试剂盒的解聚模块的一个或多个柔性容器包含一个或多个可密封开口。

[0889] 21. 如段落20所述的方法, 其中无菌试剂盒的解聚模块的柔性容器包含可热密封的熔接口。

[0890] 22. 如段落1所述的方法, 其中无菌试剂盒的一个或多个柔性容器包含内部圆形边缘。

[0891] 23. 如段落1所述的方法, 其中无菌试剂盒的解聚模块的一个或多个柔性容器包含经调适以机械地挤压及剪切其中的固体组织的解聚表面。

[0892] 24. 如段落1所述的方法, 其中无菌试剂盒的富集模块的一个或多个柔性容器包含保留细胞化解聚固体组织的保留物的过滤器。

[0893] 25. 如段落1所述的方法, 其中无菌试剂盒的稳定化模块的一个或多个柔性容器包含用于将活细胞储存为溶液形式或在冷藏保存状态下的培养基制剂。

[0894] 26. 如段落1所述的方法, 其中无菌试剂盒进一步包含数码、电子或电磁标签识别符。

[0895] 27. 如段落26所述的方法, 其中无菌试剂盒的标签识别符关于一种特定程序, 其定义: 一种类型的解聚和/或富集和/或稳定化过程; 在该过程中使用的一种或多种类型的培养基; 包括适合于受控速率冷冻的可选的冷冻溶液。

[0896] 28. 如段落1所述的方法, 其中相同柔性容器可形成解聚模块、稳定化模块及可选的富集模块中的一个或多个的一部分。

[0897] 29. 如段落1所述的方法, 其中无菌试剂盒的解聚模块包含用于接收待处理的组织的第一柔性容器。

[0898] 30. 如段落1所述的方法, 其中无菌试剂盒的解聚模块包含第二柔性容器, 其包含

用于解聚的培养基。

[0899] 31.如段落1所述的方法,其中无菌试剂盒的可选的富集模块包含第一柔性容器及用于接收富集的滤液的第三柔性容器。

[0900] 32.如段落1所述的方法,其中无菌试剂盒的解聚模块及稳定化模块均包含第二柔性容器,且其中第二容器包含消化培养基及稳定化培养基。

[0901] 33.如段落1所述的方法,其中无菌试剂盒的稳定化模块包含第四柔性容器,其包含稳定化培养基。

[0902] 34.如段落1所述的方法,其中无菌试剂盒的稳定化模块亦包含用于储存和/或经历冷藏保存的第一柔性容器和/或第三柔性容器。

[0903] 35.一种分离冷藏保存的、未经修饰的肿瘤浸润淋巴细胞 (UTIL) 的治疗性群体的方法,其包含:(a) 从对象切除肿瘤;(b) 在用于对来自哺乳动物固体组织的细胞或细胞聚集体进行半自动化无菌解聚和/或富集和/或稳定化的自动化装置中储存切除的肿瘤,该自动化装置包含可程序化处理器及一次性无菌试剂盒,其中无菌试剂盒包含:用于接收及处理包含固体哺乳动物组织的材料的解聚模块;用于过滤解聚的固体组织材料及分离未解聚组织及滤液的可选的富集模块;及用于可选地进一步处理和/或储存解聚的产物材料的稳定化模块,其中模块中的每一个包含一个或多个柔性容器,该一个或多个柔性容器通过一个或多个管道连接,所述管道经调适以使得组织材料能够其间流动;及其中模块中的每一个包含一个或多个端口以准许将培养基和/或试剂无菌输入至一个或多个柔性容器中;(c) 无菌解聚切除的肿瘤,从而产生经解聚的肿瘤,其中若切除的肿瘤可在无细胞损伤下冷藏保存,则充分解聚;(d) 在稳定化模块中冷藏保存经解聚的肿瘤;(e) 通过在包含IL-2的细胞培养基中培养经解聚的肿瘤来进行第一扩增,以产生UTIL的第一群体;(f) 通过与额外的IL-2、OKT-3及抗原呈递细胞(APC)一起培养UTIL的第一群体来进行第二扩增,以产生TIL的第二群体;(g) 收集和/或冷藏保存UTIL的第二群体。在一些实施例中,步骤a)为可选的。

[0904] 36.如段落35所述的方法,其中自动化装置进一步包含用于识别无菌试剂盒的射频鉴别标签读取器。

[0905] 37.如段落36所述的方法,其中自动化装置的可程序化处理器能够通过标签识别无菌试剂盒且随后执行定义解聚、富集及稳定化过程类型及这些过程所需的相应培养基类型的试剂盒程序。

[0906] 38.如段落35所述的方法,其中自动化装置的可程序化处理器经调适以与以下的一个或多个通信且控制以下的一个或多个:解聚模块;富集模块;及稳定化模块。

[0907] 39.如段落38所述的方法,其中自动化装置的可程序化处理器控制解聚模块以使得能够物理和/或生物分解固体组织材料。

[0908] 40.如段落39所述的方法,其中可程序化处理器控制解聚模块以使得能够物理及酶分解固体组织材料。

[0909] 41.如段落40所述的方法,其中固体组织材料的酶分解是通过一种或多种培养基酶溶液,所述培养基酶溶液选自自由以下组成的组:胶原蛋白酶、胰蛋白酶、脂肪酶、玻尿酸酶、脱氧核糖核酸酶、Liberase HI、胃蛋白酶及其混合物。

[0910] 42.如段落35所述的方法,其中可程序化处理器控制解聚柔性容器内的解聚表面,其机械地挤压及剪切固体组织,可选地,其中的解聚表面为机械活塞。

[0911] 43.如段落35所述的方法,其中可程序化处理器控制稳定化模块,以冷藏保存容器中的富集的解聚固体组织,可选地使用可程序化温度。

[0912] 44.如段落35所述的方法,其中自动化装置进一步以任何组合包含以下中的一个或多个:能够在将解聚的固体组织转移至可选的富集模块之前识别解聚过程是否已在解聚模块中完成的传感器;测定解聚模块、富集模块和/或稳定化模块中的一个或多个的容器所需的培养基的量,且控制材料在相应容器之间的转移的重量传感器;控制解聚模块、富集模块和/或稳定化模块中的一个或多个的容器内的温度的传感器;控制培养基在模块中的各容器的输入与输出端口之间的转移的至少一个气泡传感器;控制培养基在输入与输出端口之间的转移的至少一个泵,可选为蠕动泵;评估富集模块内的压力的压力传感器;控制富集模块内的切向流过滤过程的一个或多个阀;和/或控制培养基在各模块的输入与输出端口之间的转移的一个或多个夹具。

[0913] 45.如段落35所述的方法,其中自动化装置的可程序化处理器经调适以维持稳定化模块中的最佳储存温度范围直至容器经移除;或执行受控冷冻步骤。

[0914] 46.如段落35所述的方法,其中自动化装置进一步包含用户接口。

[0915] 47.如段落46所述的方法,其中接口包含用以显示指令的显示屏,所述指令指导用户输入参数、确认预程序化的步骤、警告错误或其组合。

[0916] 48.如段落35所述的方法,其中自动化装置经调适成可移动的

[0917] 49.一种用于分离UTIL的治疗性群体的半自动无菌组织处理方法,其包含以下步骤:(a) 从与无菌处理试剂盒相关的数码、电子或电磁标签识别符自动确定无菌解聚组织处理步骤及其相关条件,其中无菌试剂盒包含:用于接收及处理包含固体哺乳动物组织的材料的解聚模块;用于过滤解聚的固体组织材料及分离未解聚组织及滤液的可选的富集模块;及用于可选地进一步处理和/或储存解的产物材料的稳定化模块,其中每个所述的模块包含一个或多个柔性容器,该一个或多个柔性容器藉由管道连接,所述管道经调适以使得组织材料能够在其间流动;及其中每个所述的模块中包含一个或多个端口以准许将培养基和/或试剂无菌输入至一个或多个柔性容器中;(b) 从对象切除肿瘤;(c) 将肿瘤置放于无菌试剂盒的解聚模块的柔性塑料容器中;(d) 通过与以下通信且控制以下自动执行一个或多个组织处理步骤来处理肿瘤:解聚模块;其中无菌解聚切除的肿瘤,从而产生经解聚的肿瘤,其中若切除的肿瘤可在无细胞损伤下冷藏保存,则充分解聚;可选的富集模块,其中过滤经解聚的肿瘤以移除解聚的固体组织材料及分离未解聚组织及滤液;稳定化模块,其中冷藏保存经解聚的肿瘤;(e) 通过在包含IL-2的细胞培养基中培养经解聚的肿瘤来进行第一扩增,以产生UTIL的第一群体;(f) 通过与额外的IL-2、OKT-3及抗原呈递细胞(APC)一起培养UTIL的第一群体来进行第二扩增,以产生TIL的第二群体;及(g) 收集和/或冷藏保存UTIL的第二群体。

[0918] 本发明通过以下编号段落进一步描述:

[0919] 1.一种用于处理组织的柔性容器,其包含:一个或多个由可密封聚合物制成的层,其中柔性容器的至少三个边缘在制造期间密封;柔性容器上的开口边,在使用期间组织材料经其插入;及一个或多个连接器,其经配置以经导管将柔性容器耦接于至少一个组件;其中接近开口边的区段在组织材料置于柔性容器中之后密封以形成密封口。

[0920] 2.如段落1所述的柔性容器,其中密封口包含至少3mm宽的区域,其平行于开口边

且与柔性容器的开口边间隔开。

[0921] 3.如段落1所述的柔性容器,其进一步包含夹具,其具有突起且接近密封口安置,且相较于密封口,其进一步与柔性容器的开口边间隔开。

[0922] 4.如段落3所述的柔性容器,其中在使用期间,密封口与夹具的组合经配置以承受施加至柔性容器的100N力。

[0923] 5.如段落3所述的柔性容器,其中在使用期间,密封口与夹具的组合经配置以承受施加至柔性容器的75N力。

[0924] 6.如段落1所述的柔性容器,其中密封口包含至少5mm宽的区域,其平行于开口边且与柔性容器的开口边间隔开。

[0925] 7.如段落1所述的柔性容器,其中柔性容器用于解聚组织材料。

[0926] 8.如段落1所述的柔性容器,其中柔性容器用于解聚组织材料、过滤解聚组织材料及分离未解聚组织及滤液。

[0927] 9.如段落1所述的柔性容器,其进一步包含弹性可变形材料。

[0928] 10.如段落1所述的柔性容器,其进一步包含一个或多个指示符。

[0929] 11.如段落1所述的柔性容器,其进一步包含一个或多个标记。

[0930] 12.如段落1所述的柔性容器,其中密封口为使用在预定压力、预定温度及预定时间范围下操作的热封机形成。

[0931] 13.如段落1所述的柔性容器,其中柔性容器经配置以与机械地挤压置放于柔性容器中的组织材料的装置一起使用。

[0932] 14.如段落1所述的柔性容器,其中柔性容器经配置以剪切组织材料。

[0933] 15.根据段落1所述的柔性容器在半自动化或自动化过程中的用途,其用于哺乳动物细胞或细胞聚集体的无菌解聚、稳定化及可选的富集。

[0934] 16.一种用于从组织提取所需材料的系统,其包含:试剂盒,所述试剂盒包含:解聚柔性容器;稳定化柔性容器;及位于解聚柔性容器或稳定化柔性容器中的至少一个上的至少一个指示标签,其能够提供组织来源、组织状态或识别符中的至少一个;能够在解聚柔性容器中处理至少一些组织以形成经处理的流体的解聚组件;能够富集经处理的流体中的至少一些以形成所需材料的富集组件;能够将所需材料的一部分储存于稳定化柔性容器中的稳定化组件;及位于解聚组件或稳定化组件中的至少一个上的至少一个指示标签读取器,其能够提供组织来源或稳定化组件处组织状态中的至少一个。

[0935] 17.如段落15所述的系统,其中所需材料包含肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)。

[0936] 18.如段落15所述的系统,其中一个或多个类型的培养基通过解聚组件及稳定化组件用于过程中。

[0937] 19.如段落15所述的系统,其进一步包含冷藏保存培养基,其用于能够以受控速率冷冻的稳定化组件中。

[0938] 20.如段落15所述的系统,其中解聚柔性容器包含具有在使用期间密封的开口边的解聚袋,且稳定化柔性容器为稳定化袋。

[0939] 21.一种用于来自哺乳动物固体组织的细胞或细胞聚集体的半自动化无菌解聚和/或富集和/或稳定化的自动化装置,其包含:可程序化处理器;及试剂盒,该试剂盒包含如段落1至15中任一所述的柔性容器中的至少一个作为解聚柔性容器。

- [0940] 22.如段落21所述的自动化装置,其进一步包含指示标签读取器。
- [0941] 23.如段落21所述的自动化装置,其进一步包含射频鉴别标签读取器,其用以识别试剂盒组件。
- [0942] 24.如段落21所述的自动化装置,其中可程序化处理器能够经标签识别试剂盒组件且随后执行定义解聚、富集及稳定化过程类型及那些过程所需的各培养基类型的程序。
- [0943] 25.如段落21所述的自动化装置,其中可程序化处理器控制自动化装置的解聚组件,以使得能够在解聚柔性容器中物理和/或生物分解固体组织。
- [0944] 26.如段落25所述的自动化装置,其中可程序化处理器控制接近解聚柔性容器的解聚表面,其机械地挤压及剪切安置于解聚柔性容器中的固体组织,可选地,其中解聚表面为机械活塞。
- [0945] 27.如段落21所述的自动化装置,其中可程序化处理器控制自动化装置的解聚组件以使得能够在解聚柔性容器中物理及酶分解固体组织。
- [0946] 28.如段落27所述的自动化装置,其中固体组织的酶分解为通过一种或多种选自以下的培养基酶溶液:胶原蛋白酶、胰蛋白酶、脂肪酶、玻尿酸酶、脱氧核糖核酸酶、Liberase HI、胃蛋白酶或其混合物。
- [0947] 29.如段落21所述的自动化装置,其中装置包含以下中的至少两个:解聚组件;富集组件;及稳定化组件;且其中可程序化处理器经调适以与以下中的一个或多额通信且控制以下中的一个或多个:解聚组件;富集组件;及稳定化组件。
- [0948] 30.如段落29中任一所述的自动化装置,其中可程序化处理器控制稳定化组件以冷藏保存在冷藏保存容器中的富集解聚固体组织,可选地使用可程序化温度。
- [0949] 31.如段落29中任一所述的自动化装置,其中装置进一步以任何组合包含以下额外组件中的一个或多个:传感器,其能够在将解聚的固体组织转移至可选存在的富集组件之前识别解聚过程是否已在解聚组件中完成;重量传感器,其测定解聚组件、富集组件和/或稳定化组件中的一个或多个的容器中所需的培养基的量,且控制材料在各容器之间的转移;传感器,其控制解聚组件、富集组件和/或稳定化组件中的一个或多个的容器内的温度;至少一个气泡传感器,其控制培养基在组件中的各容器的输入与输出端口之间的转移;至少一个泵,其控制培养基在输入与输出端口之间的转移,可选为蠕动泵;评估富集组件内的压力的压力传感器;控制富集组件内的切向流过滤过程的一个或多个阀;和/或控制培养基在各组件的输入与输出端口之间的转移的一个或多个夹具。
- [0950] 32.如段落29所述的自动化装置,其中可程序化处理器经调适以维持稳定化组件中的最佳储存温度范围直至容器经移除;或执行受控冷冻步骤。
- [0951] 33.如任何前述段落所述的自动化装置,其进一步包含用户接口。
- [0952] 34.如段落26所述的自动化装置,其中接口包含用以显示指令的显示屏,这些指令指导用户输入参数、确认预程序化的步骤、警告错误或其组合。
- [0953] 35.如段落21所述的自动化装置,其中自动化装置经调适成可移动的。
- [0954] 36.一种自动组织处理方法,其包含:从与试剂盒相关的数码、电子或电磁标签指示符自动确定用于处理步骤的条件及其相关条件;将组织样品置放于试剂盒所述的柔性容器中;及
- [0955] 密封柔性容器的至少一个边缘;通过与指示符通信及控制柔性容器,以自动执行

一个或多个组织处理步骤来处理组织样品;及过滤经处理组织样品的至少一部分以产生经过滤的流体;及提供经过滤的流体中的至少一些至冷藏保存柔性容器。

[0956] 37.如段落31所述的方法,其中处理包含搅拌、提取及酶消化柔性容器中组织样品的至少一部分。

[0957] 38.如段落31所述的方法,其中处理包含搅拌、提取及酶消化柔性容器中组织样品的至少一部分且引起所期望的材料的提取。

[0958] 39.如段落31所述的方法,其中处理包含搅拌、提取及酶消化柔性容器中组织样品的至少一部分且引起肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)的提取。

[0959] 40.如段落31所述的方法,其中柔性容器包含可热密封材料。

[0960] 41.如段落31所述的方法,其中柔性容器包含EVA、乙酸乙烯酯及聚烯烃聚合物混合物或聚酰胺中的至少一个。

[0961] 经如此详细描述了本发明的优选实施例,应当理解,由以上段落定义的本发明不限于以上描述中阐述的特定细节,因为其许多明显的变化是可能的,无需背离本发明的精神或范围。

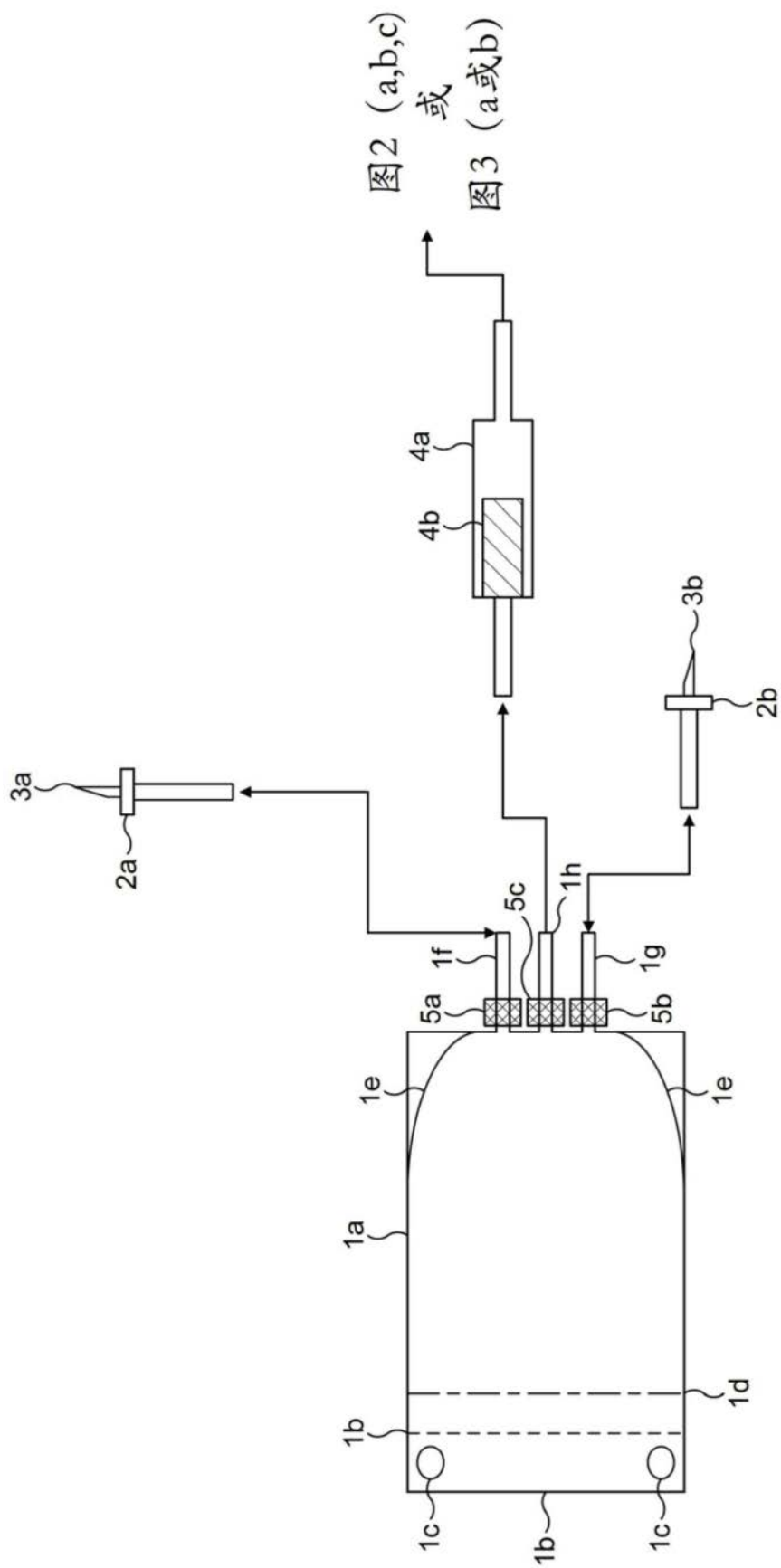


图1

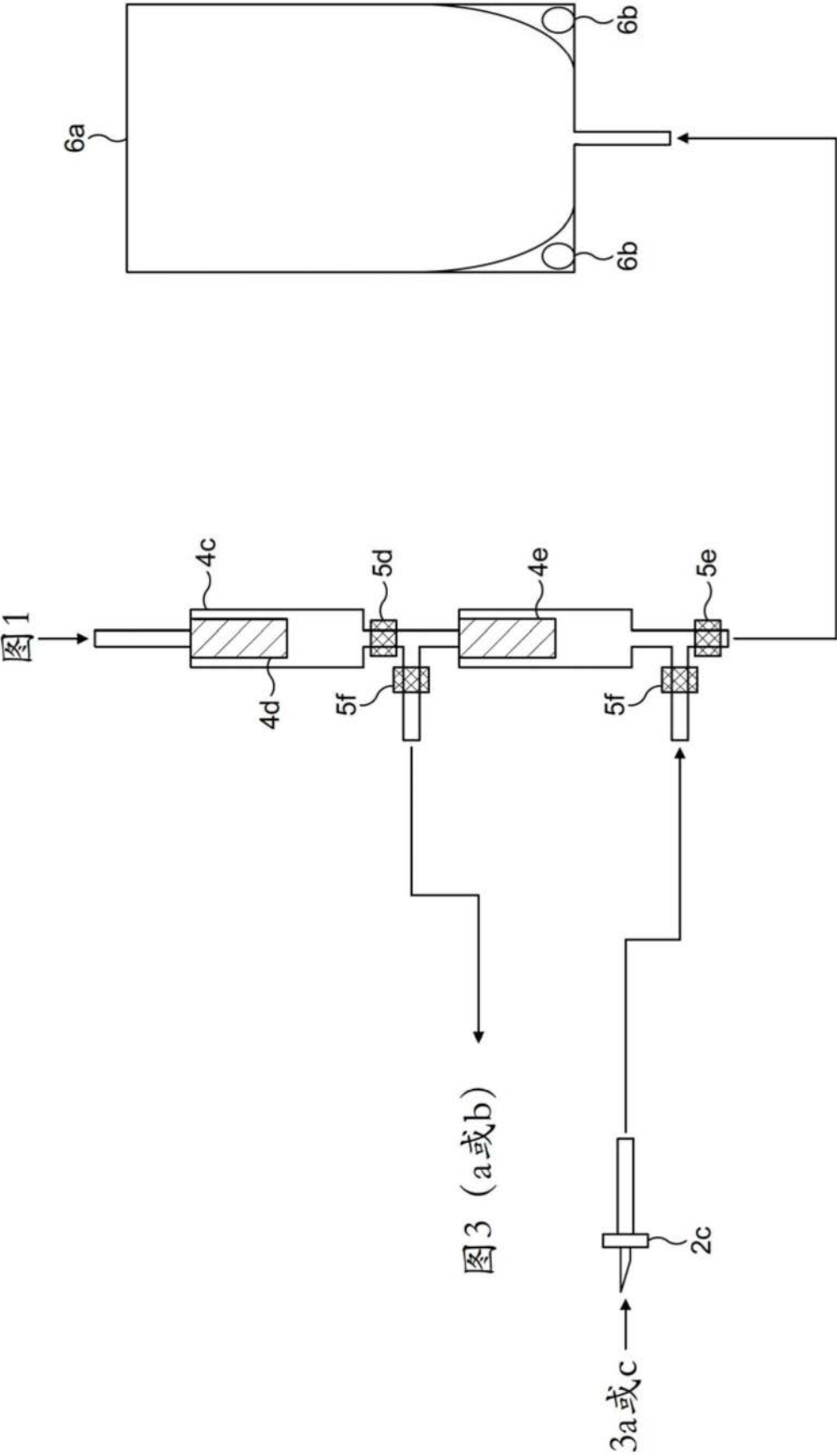


图3 (a或b)

图2A

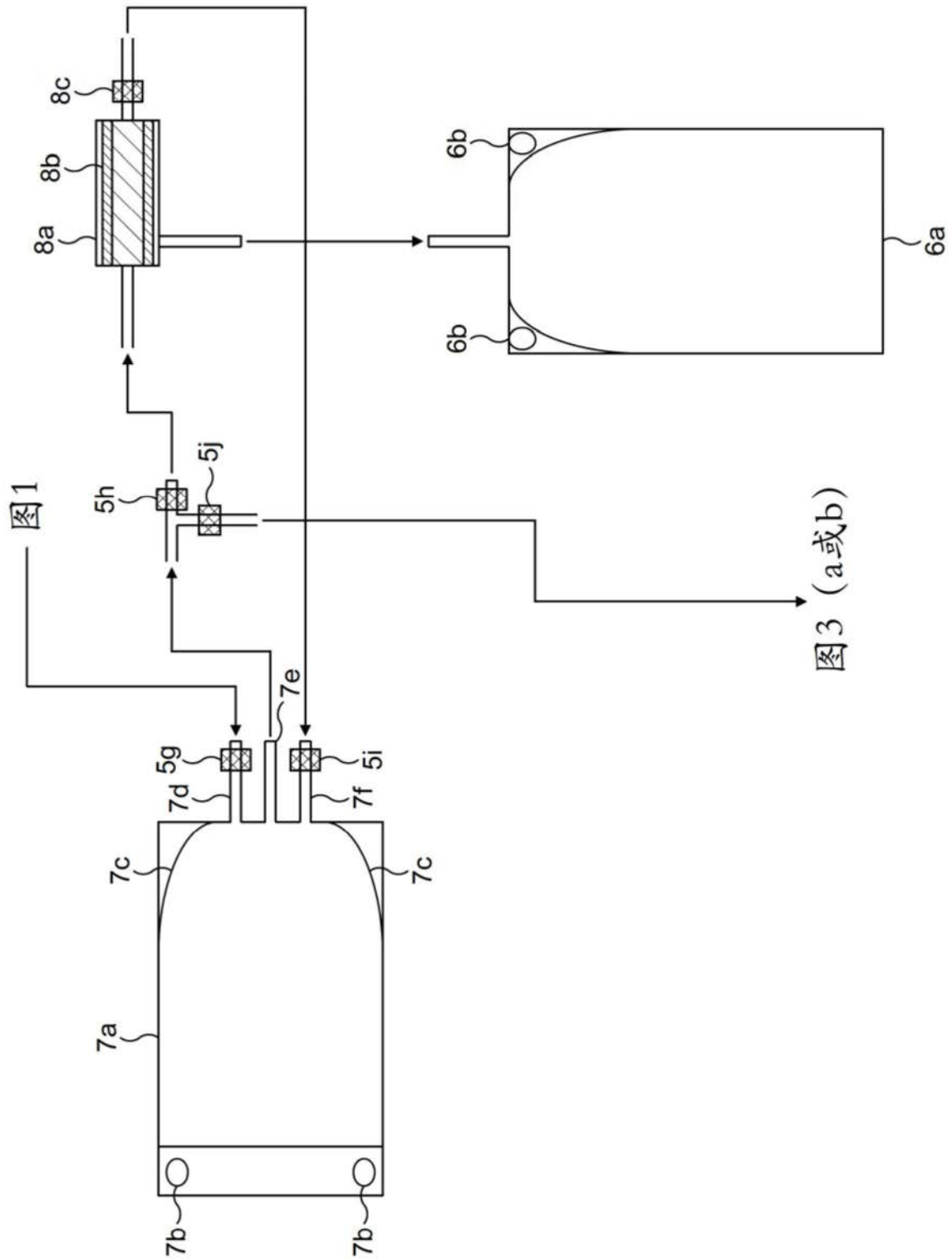


图2B

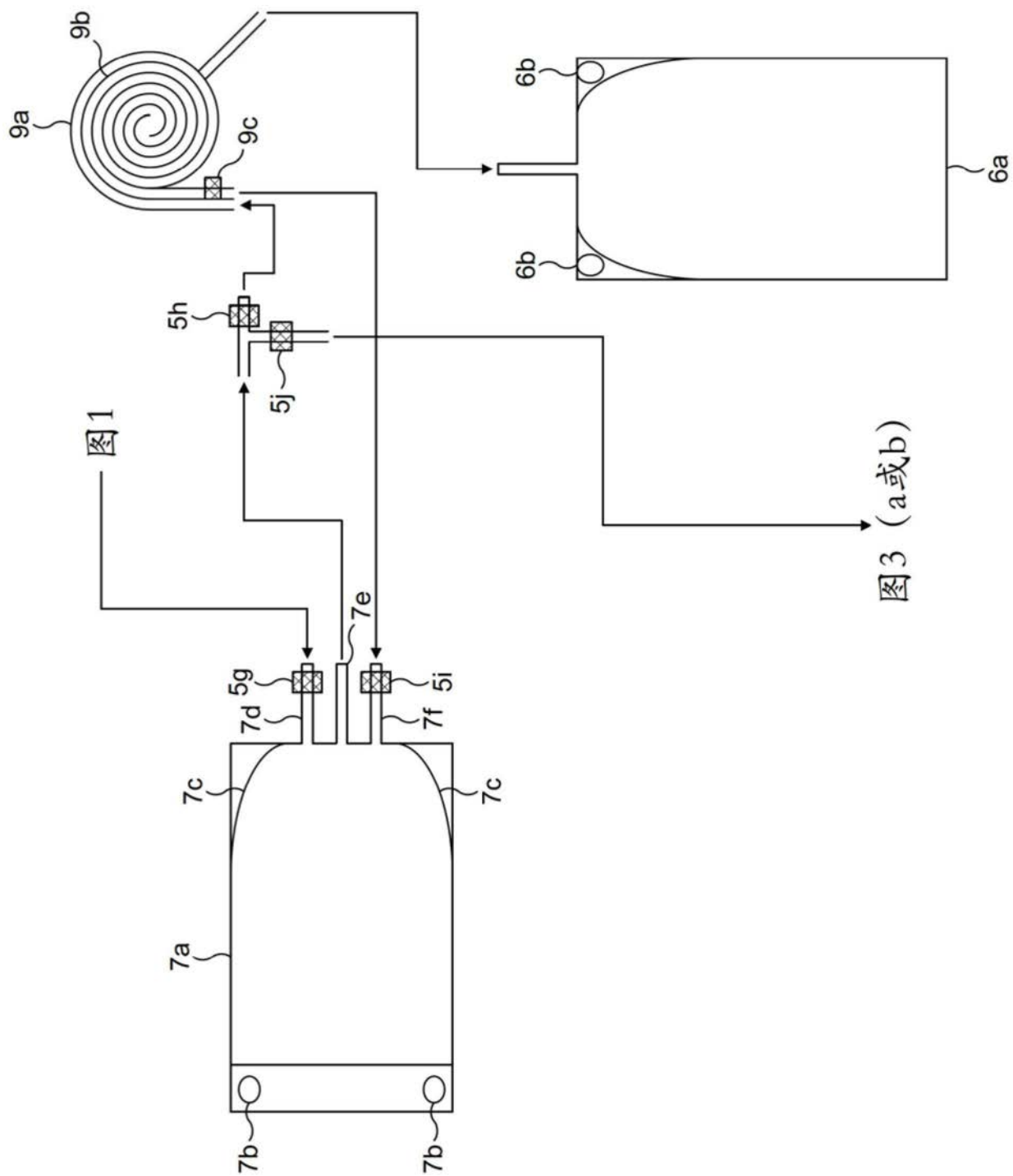


图1, 图2a, 2b或2c

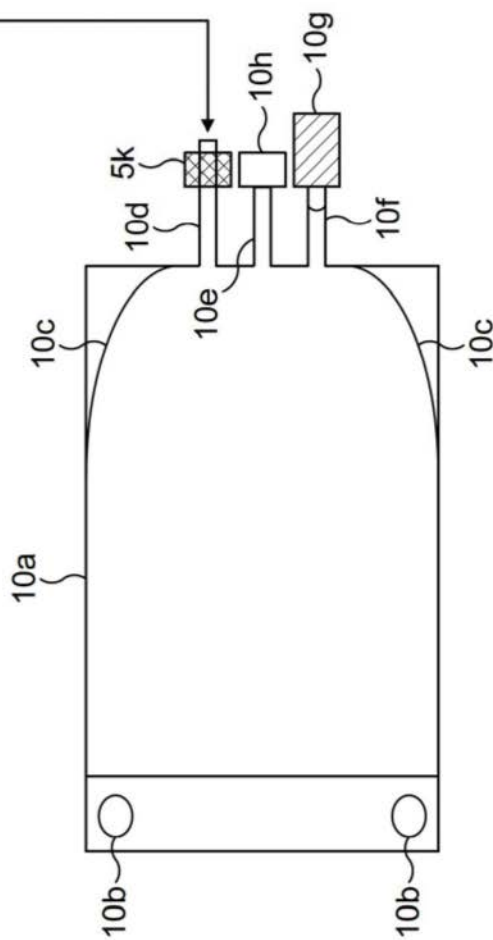


图3A

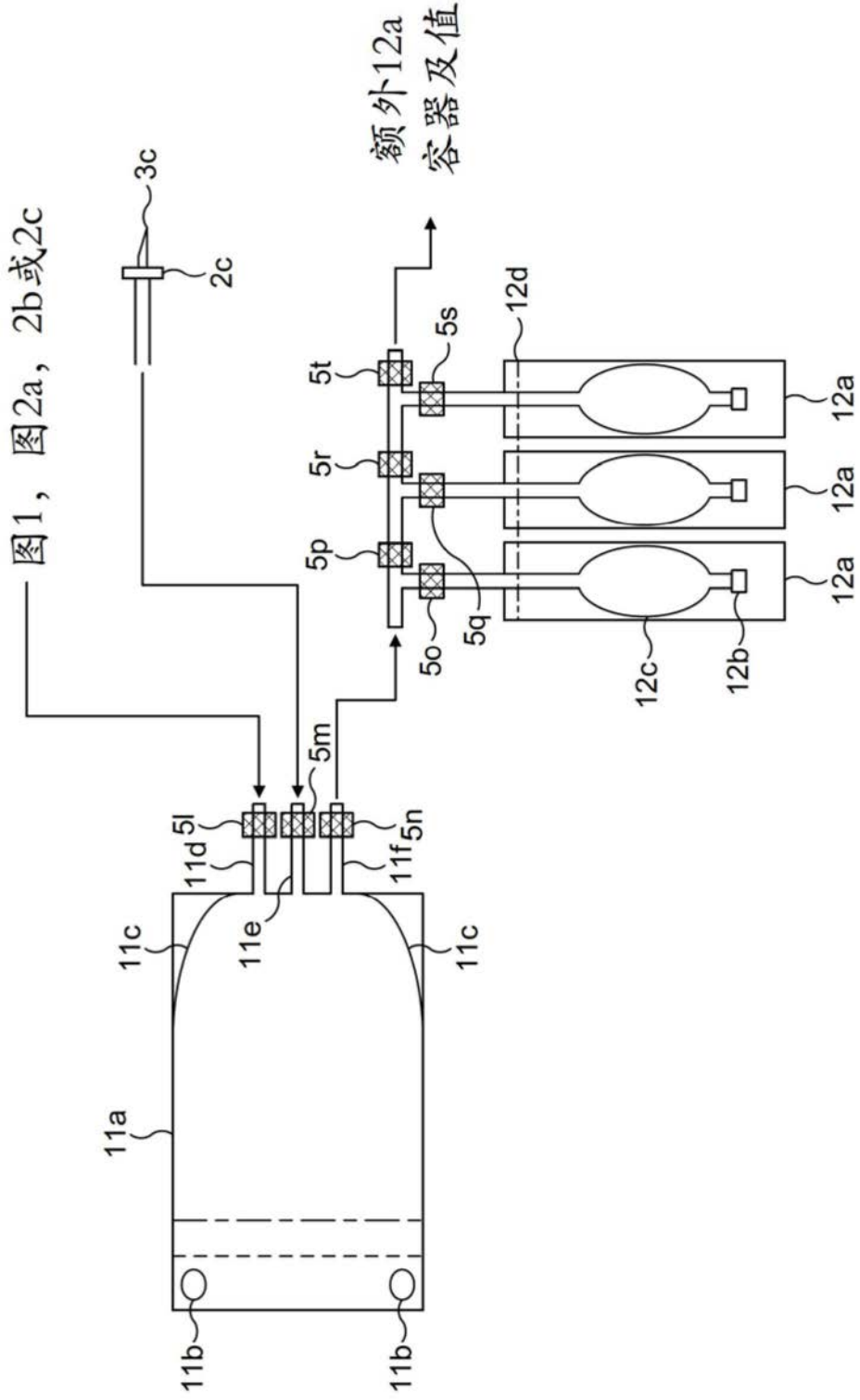


图3B

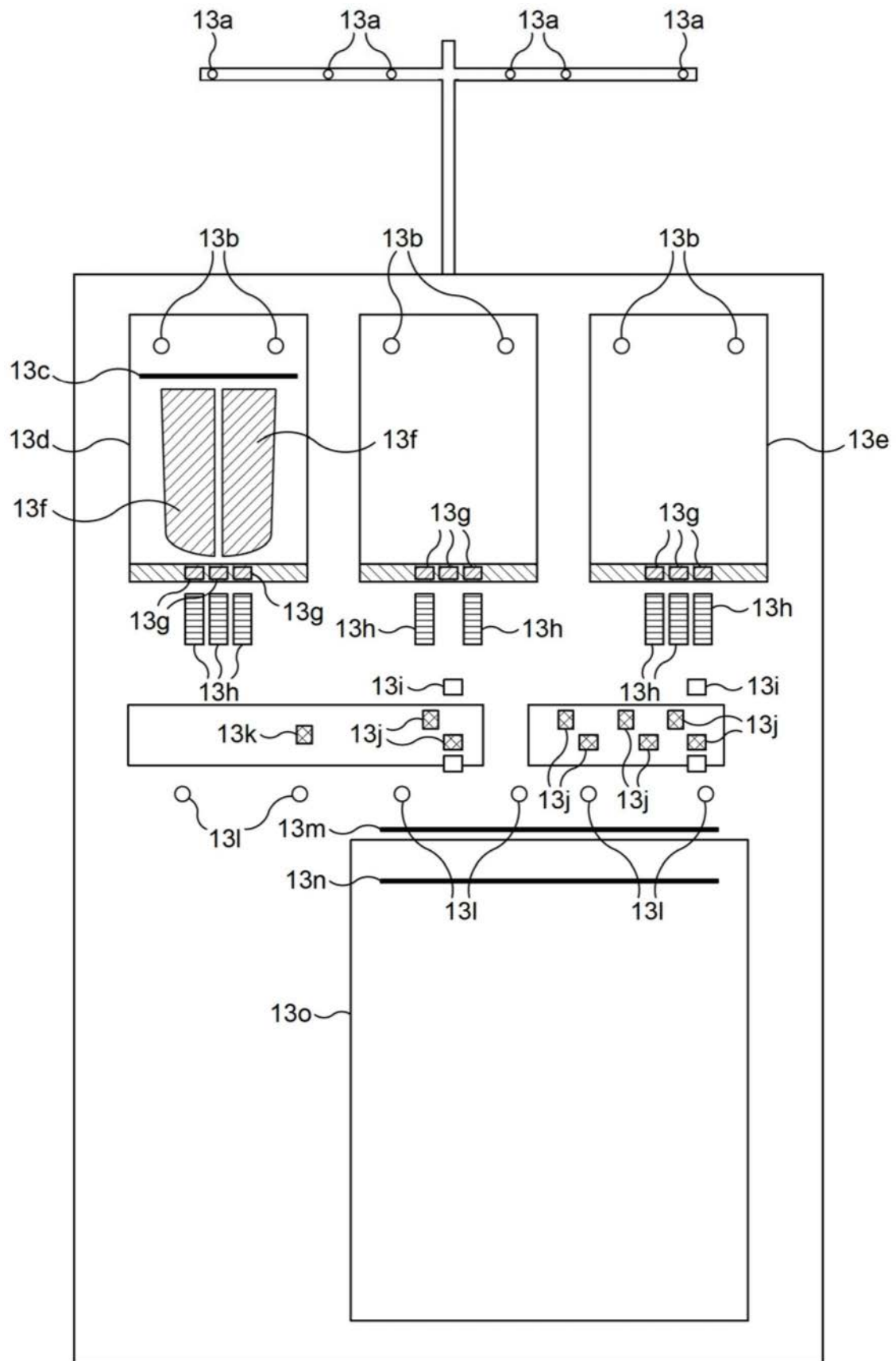


图4

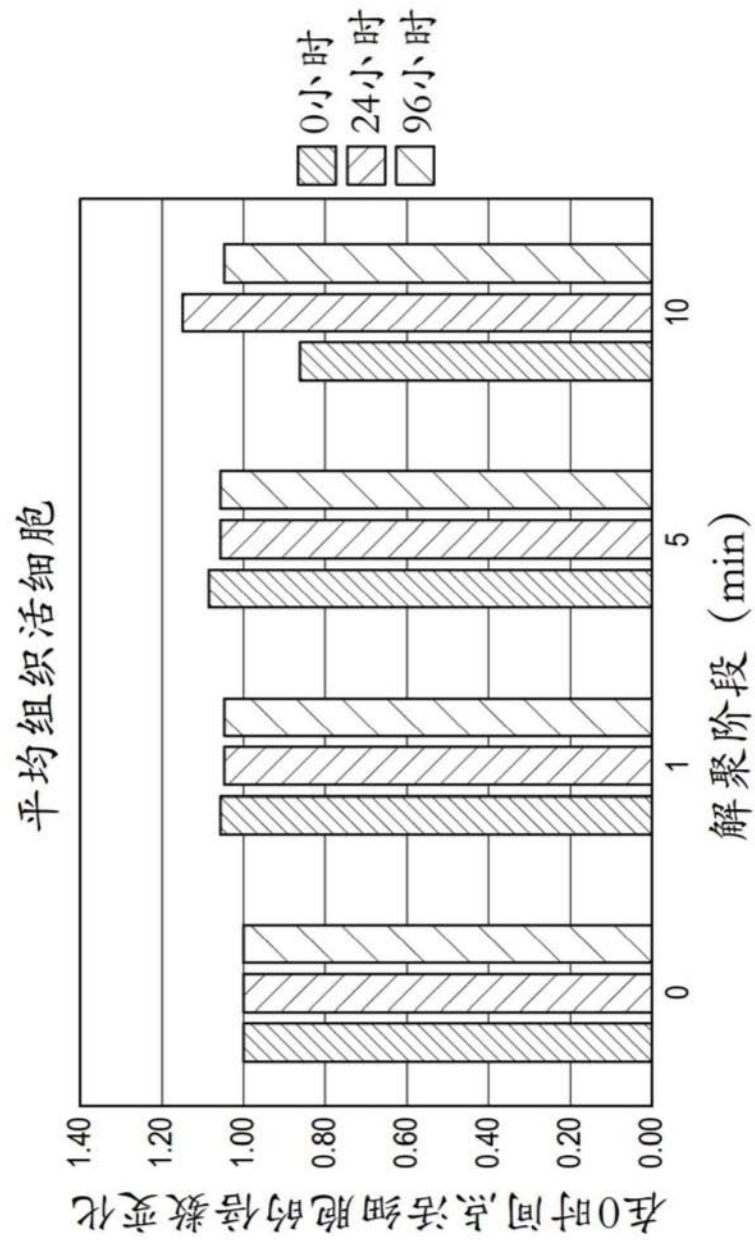


图5

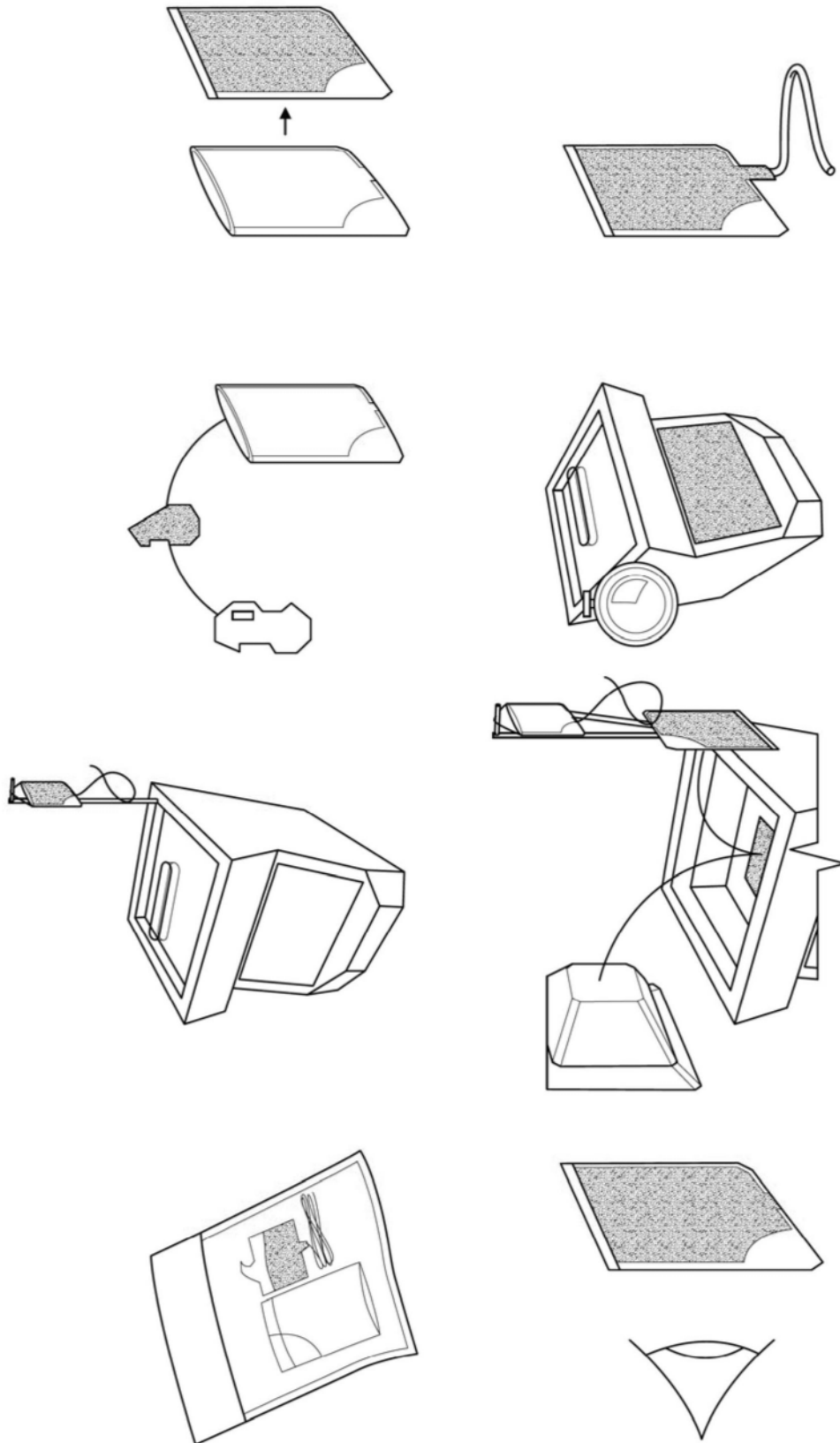


图6

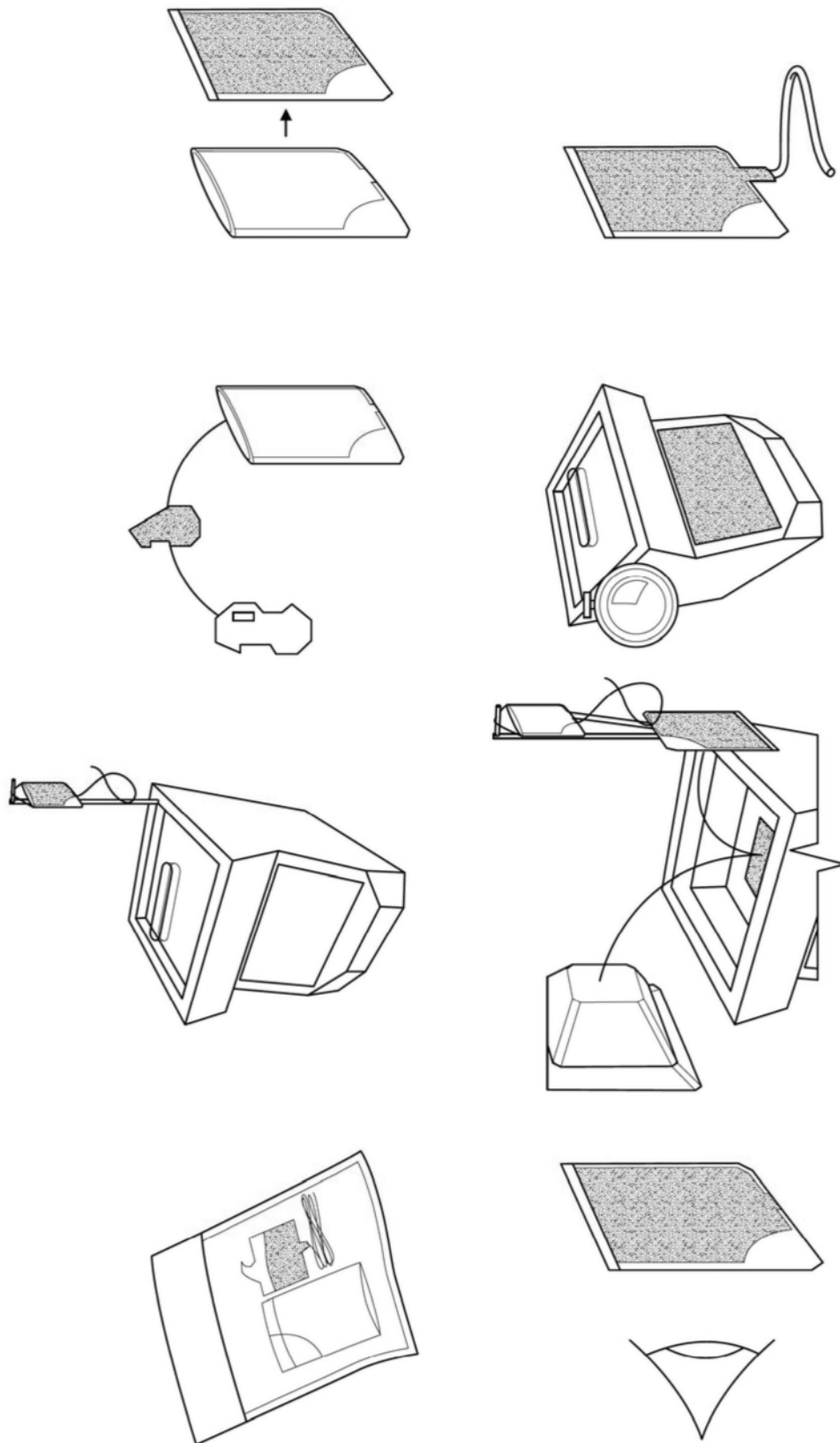


图7

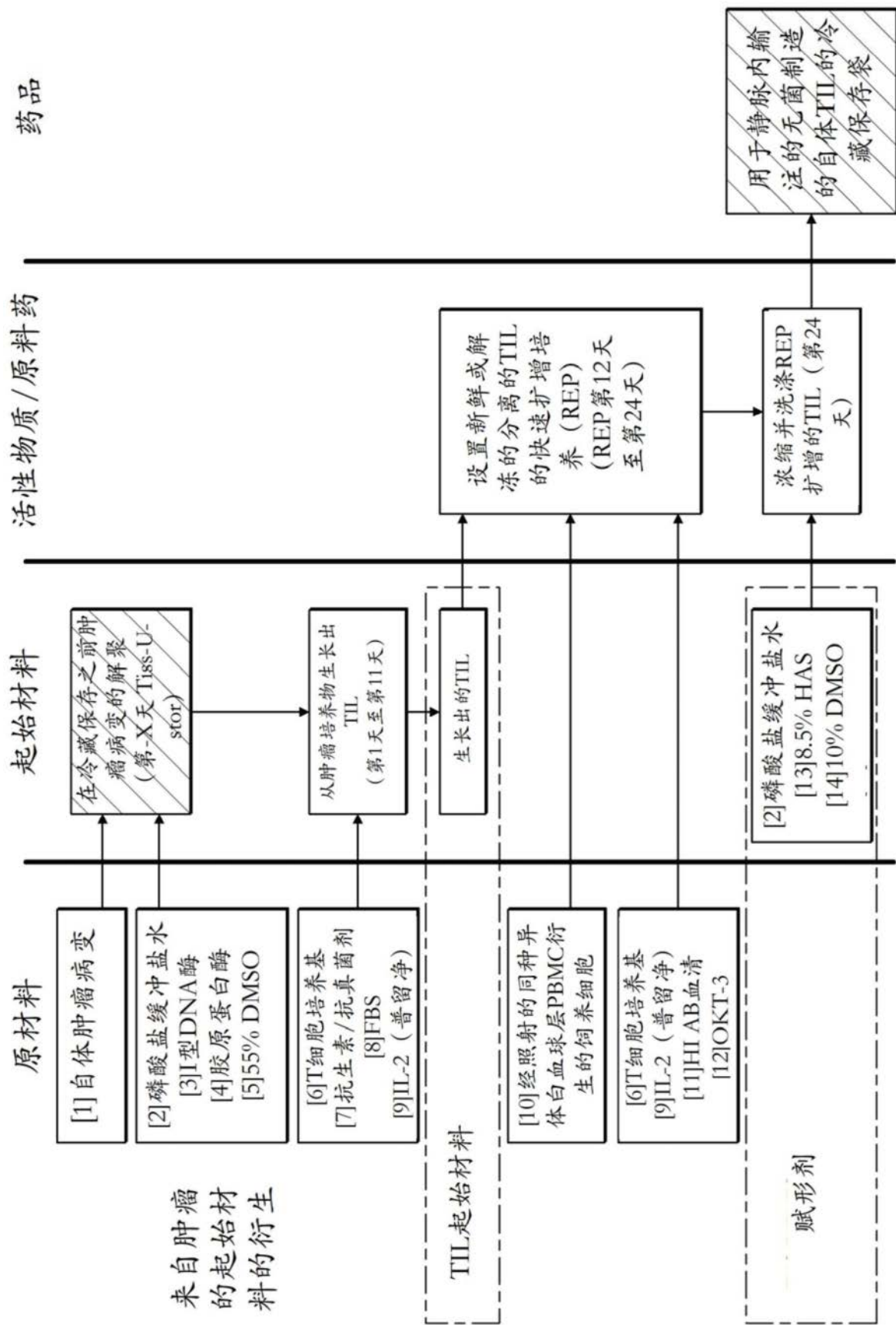


图8

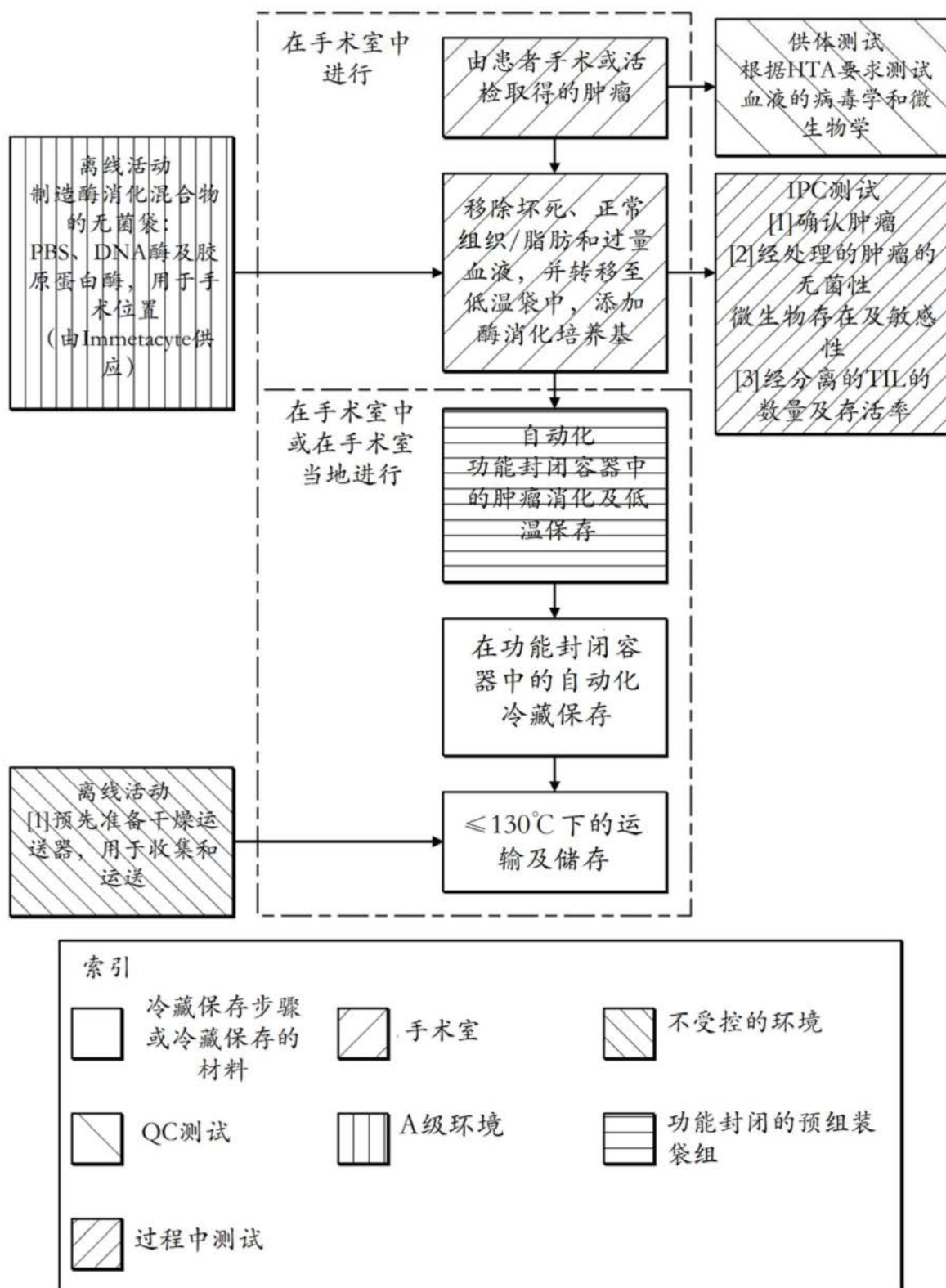


图9

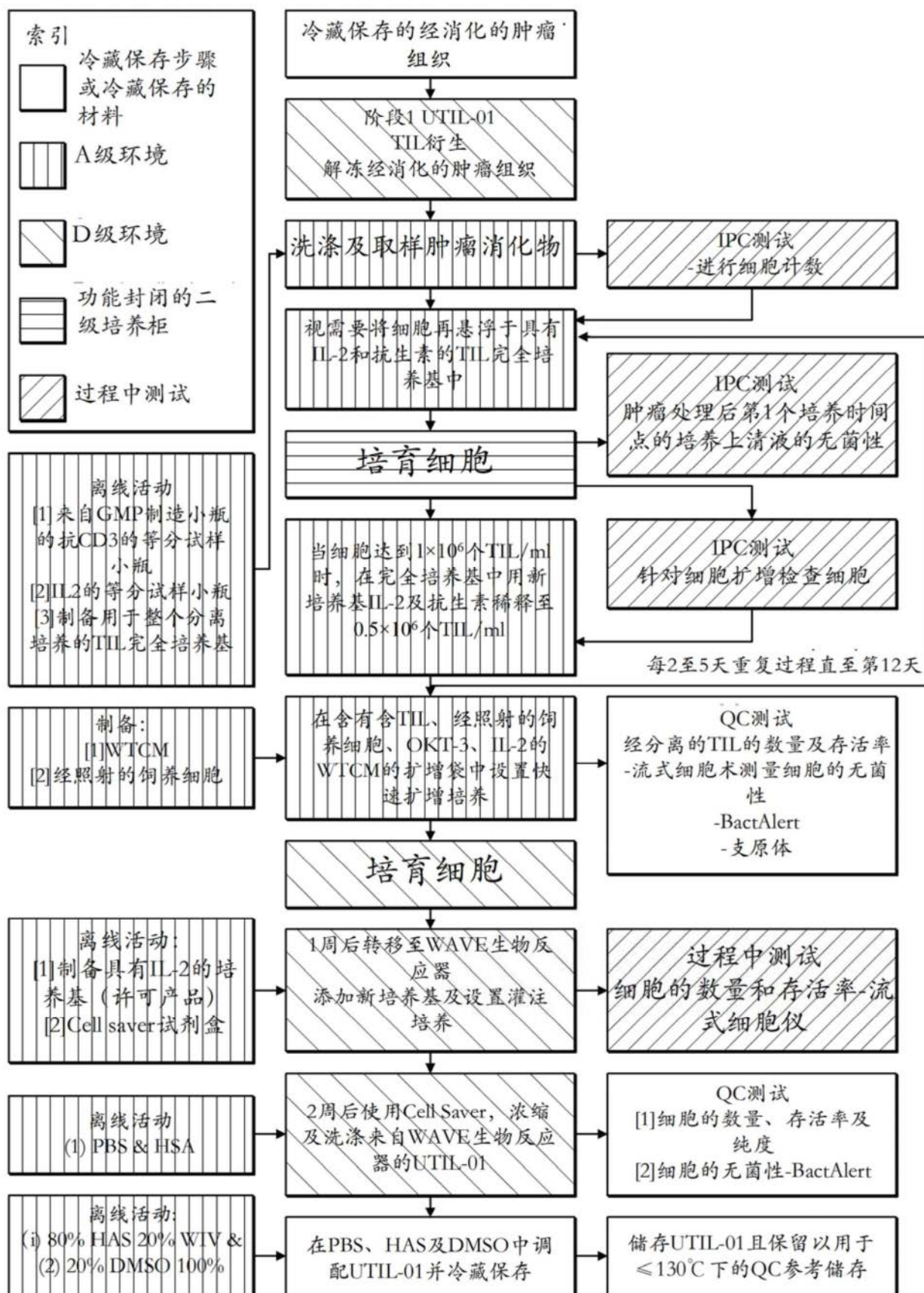


图10

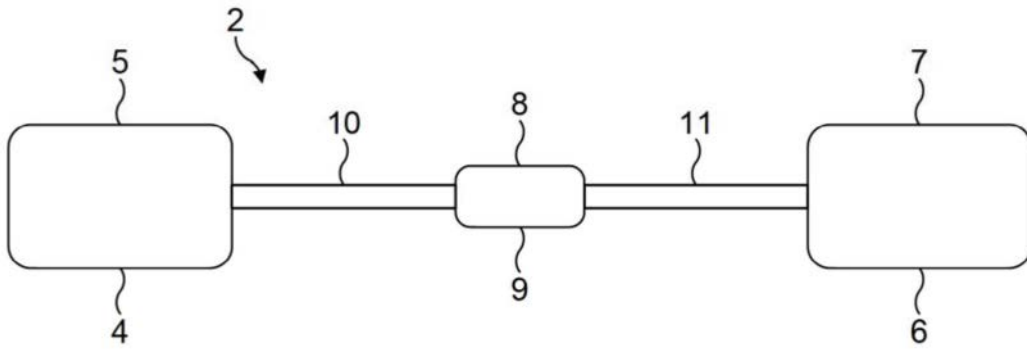


图11A

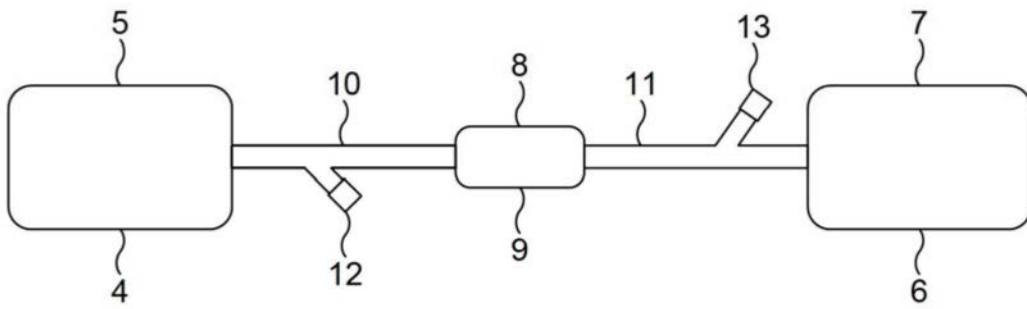


图11B

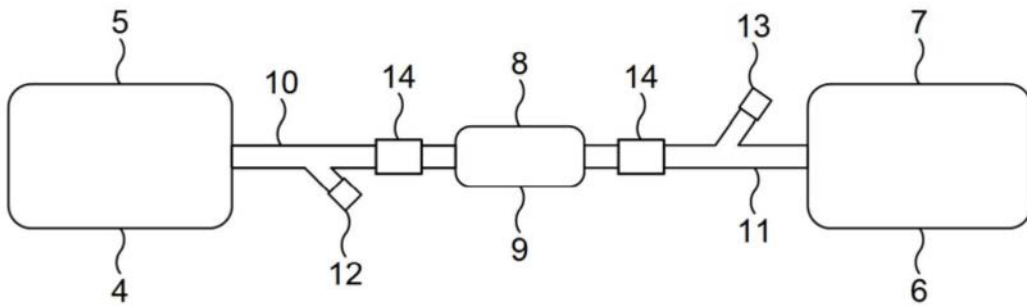


图11C

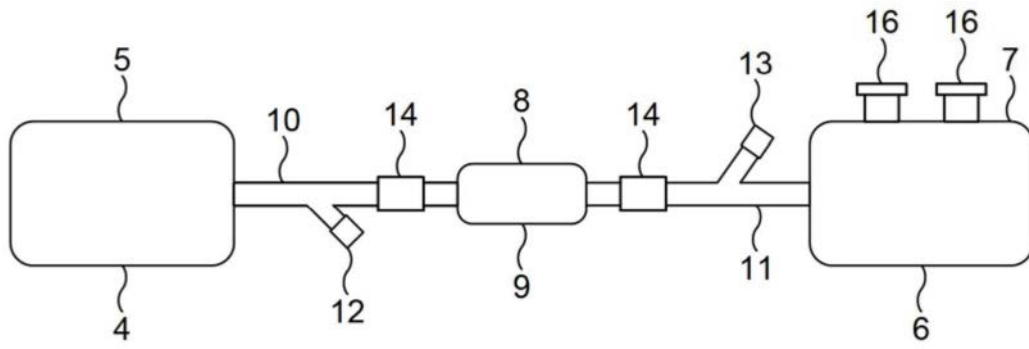


图11D

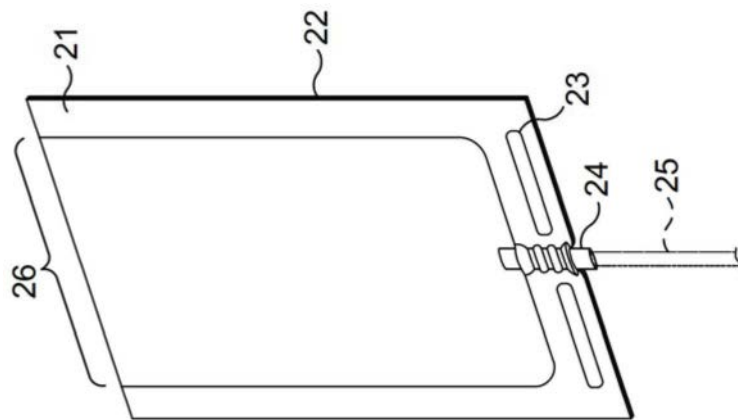


图12A

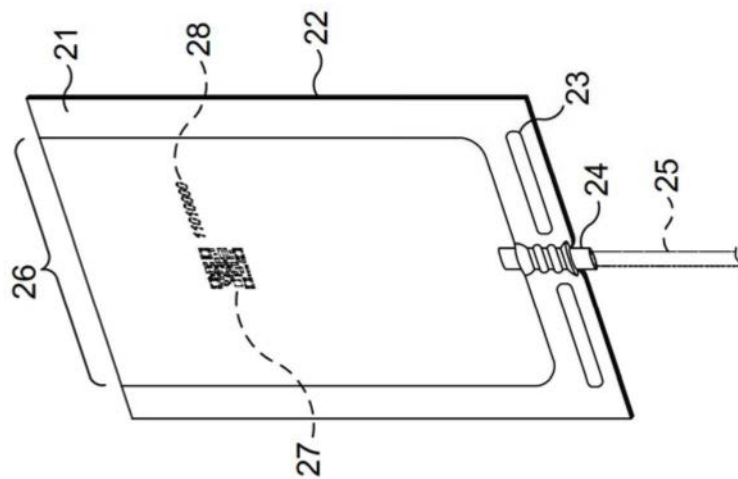


图12B

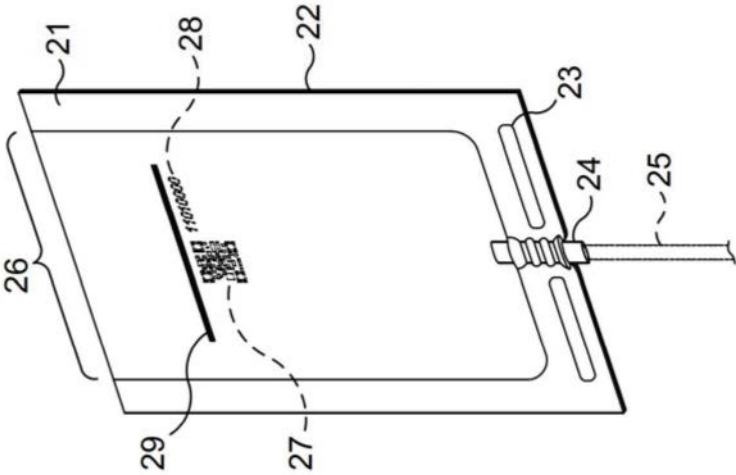


图12C

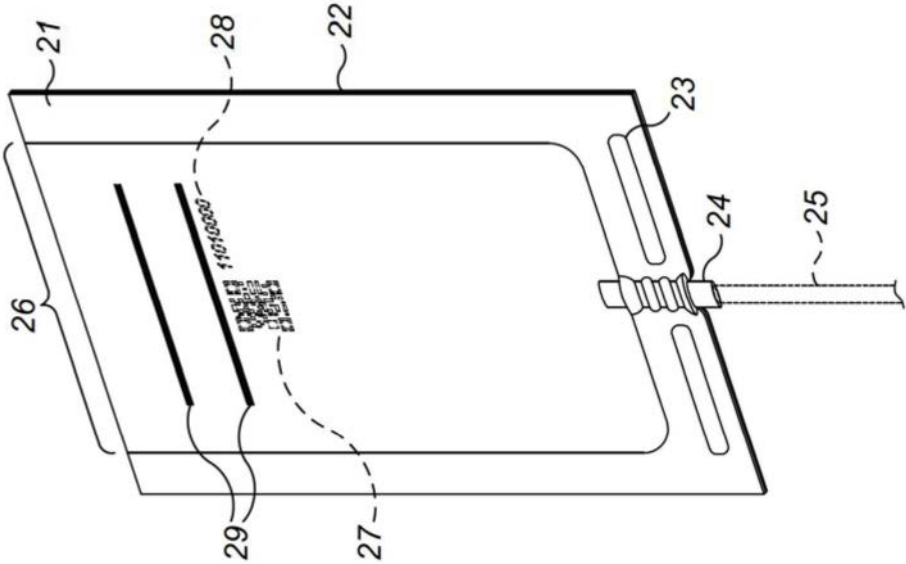


图12D

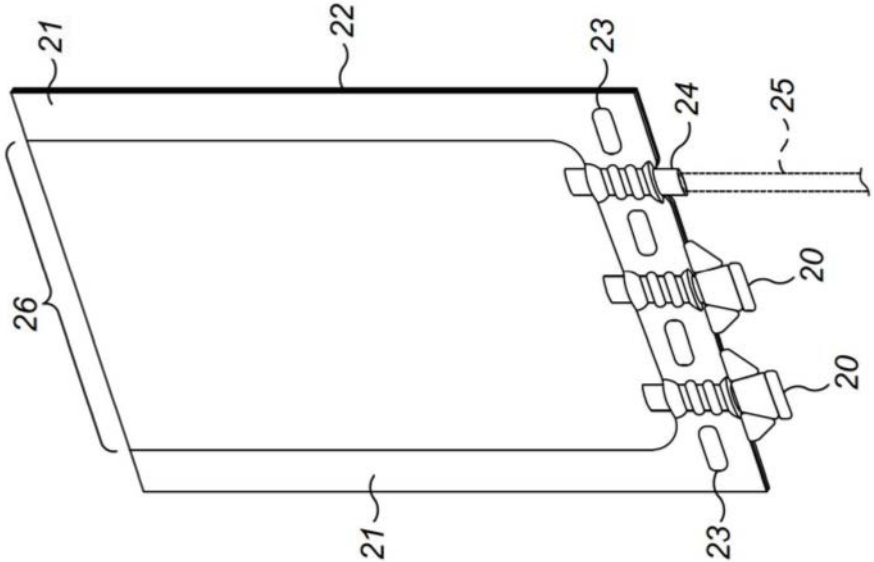


图12E

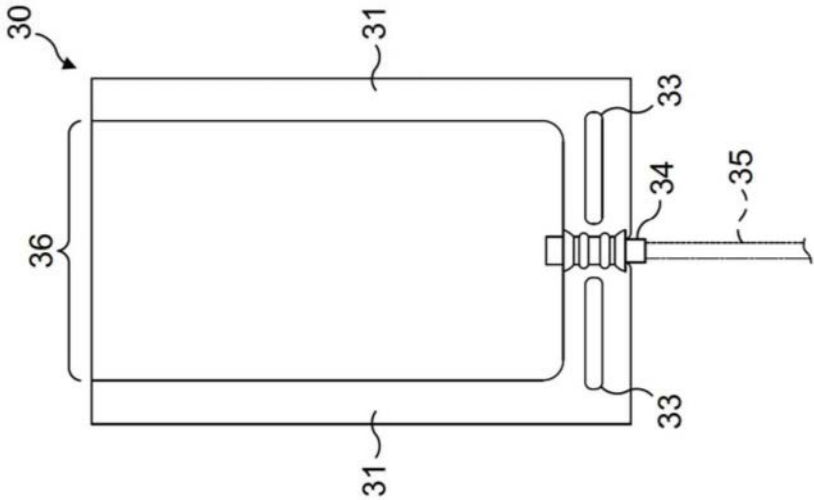


图13A

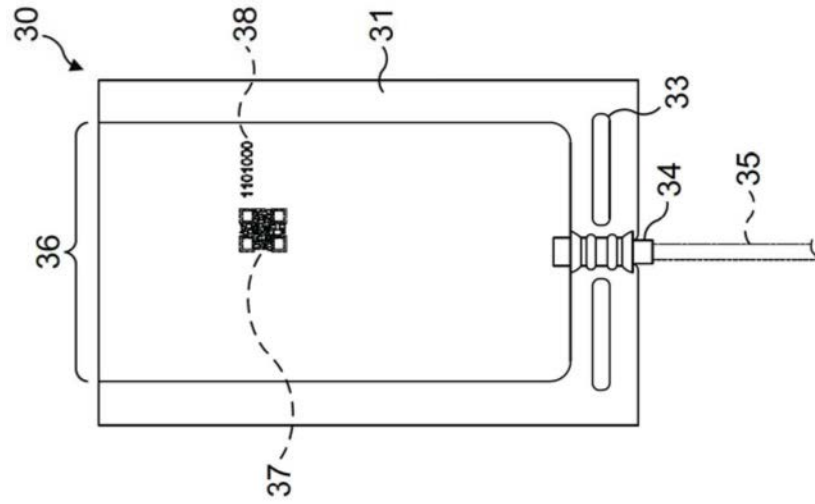


图13B

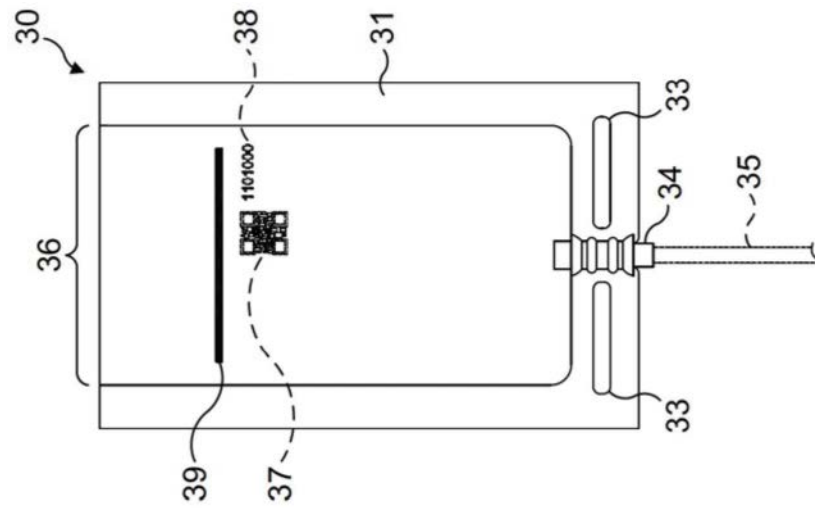


图13C

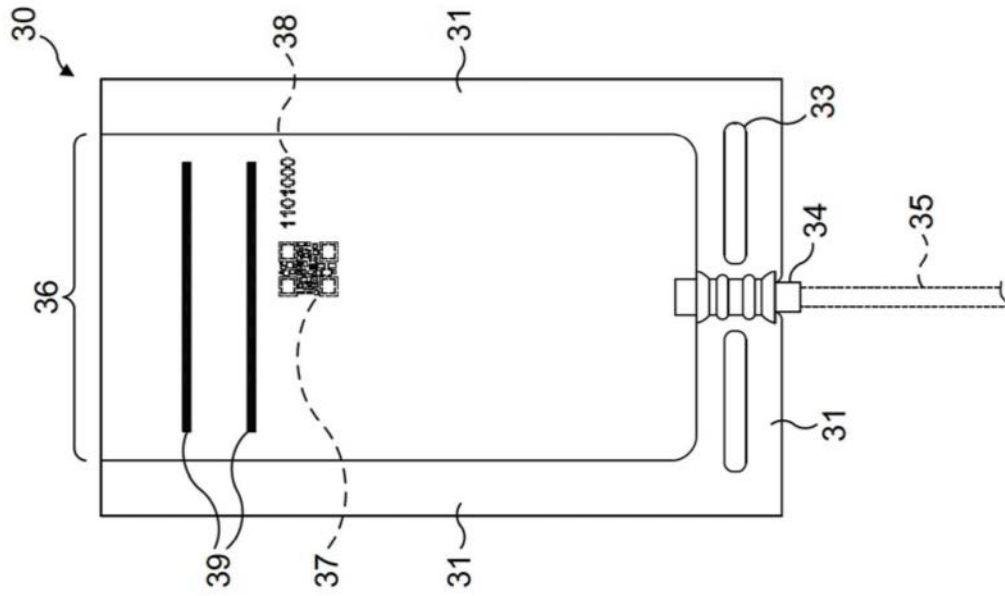


图13D

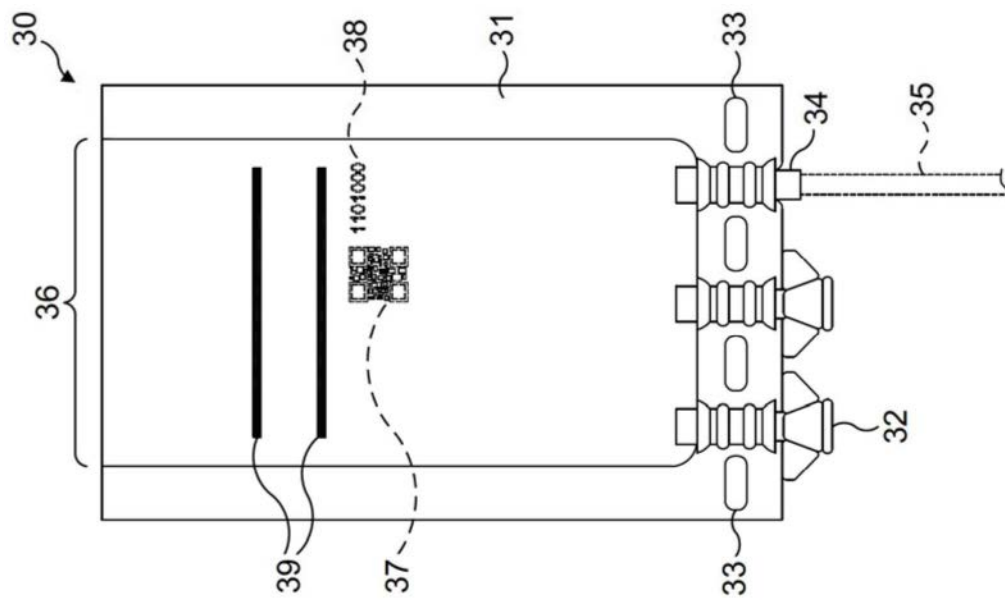


图13E

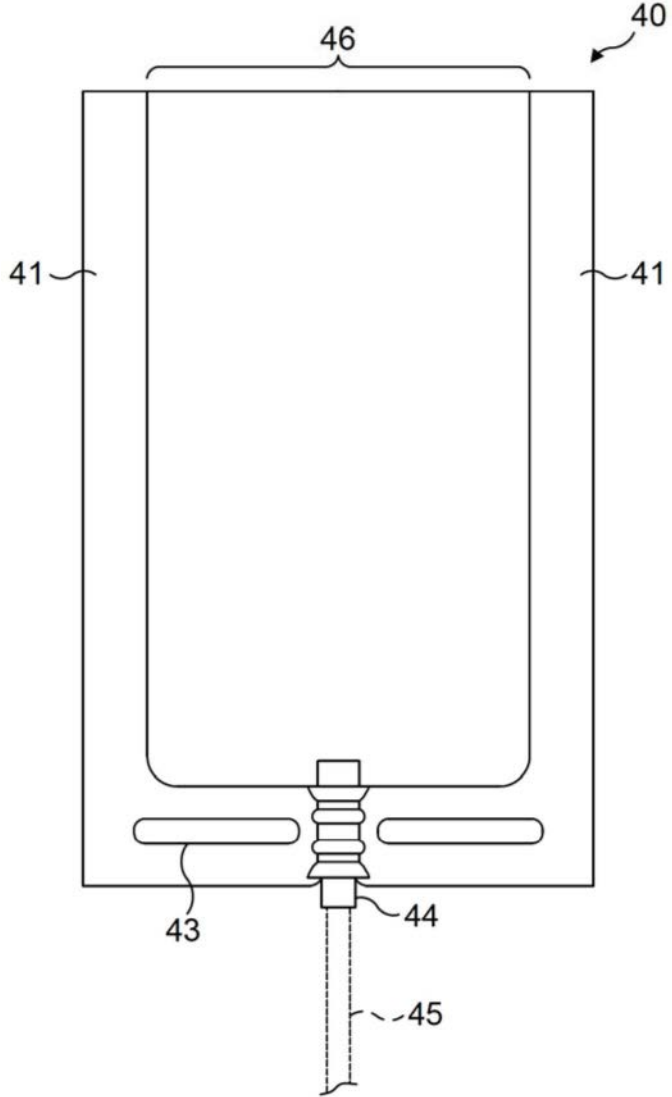


图14

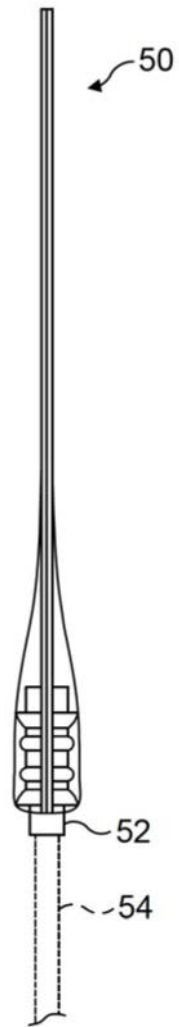


图15

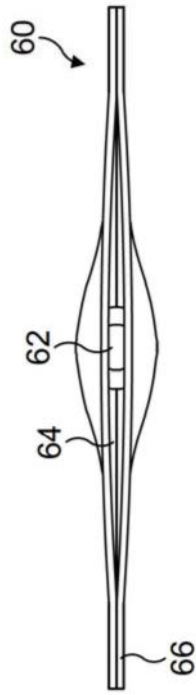


图16A

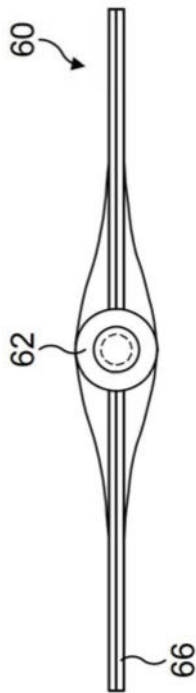


图16B

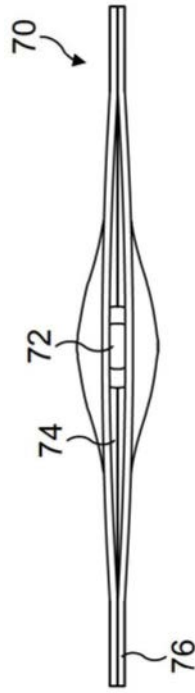


图17A

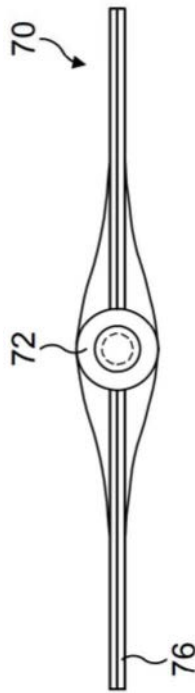


图17B

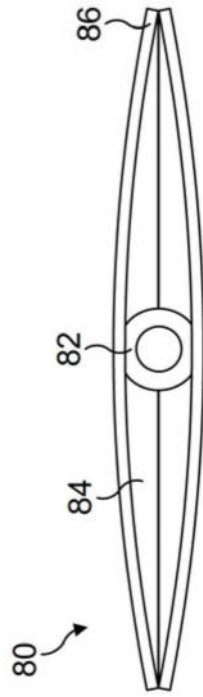


图18A

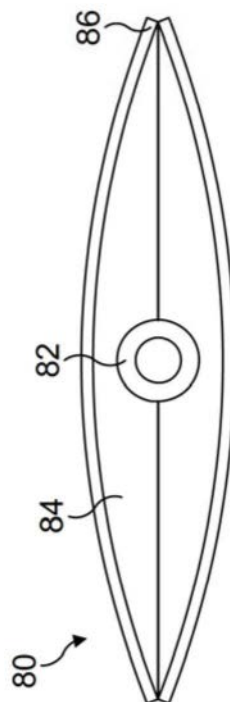


图18B

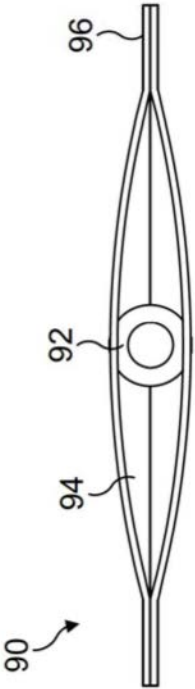


图19A

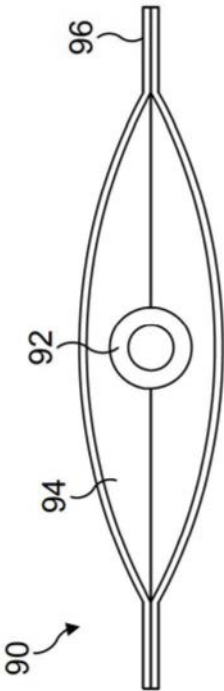


图19B

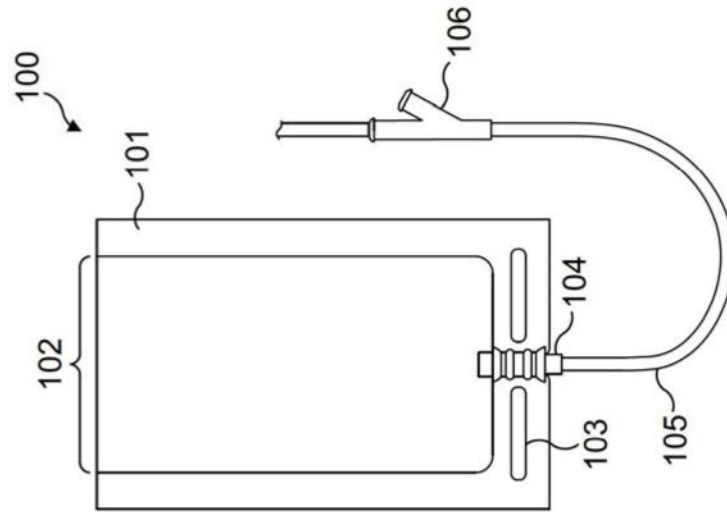


图20A

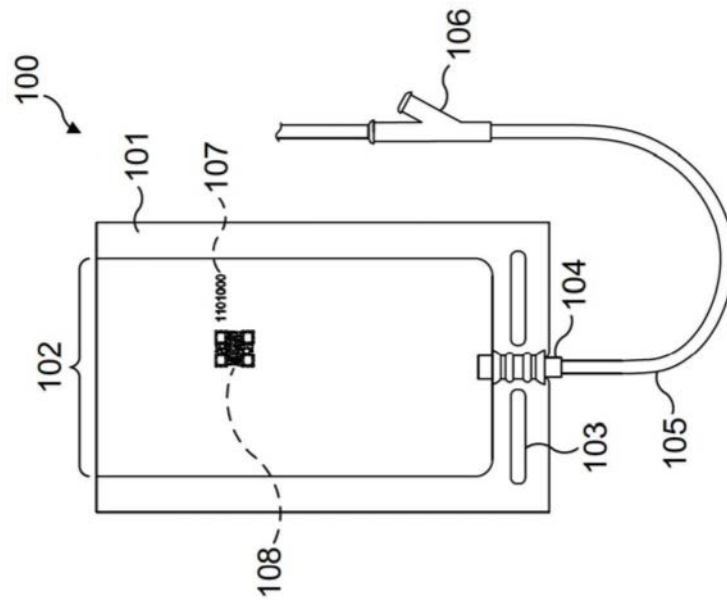


图20B

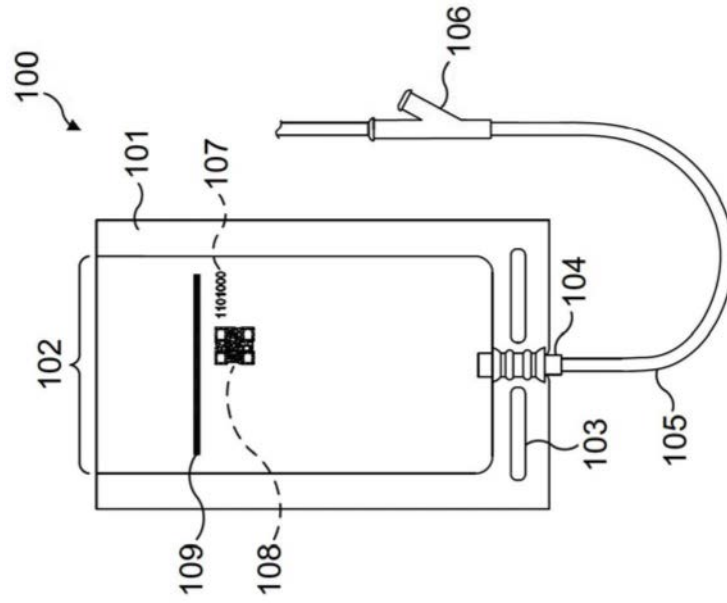


图20C

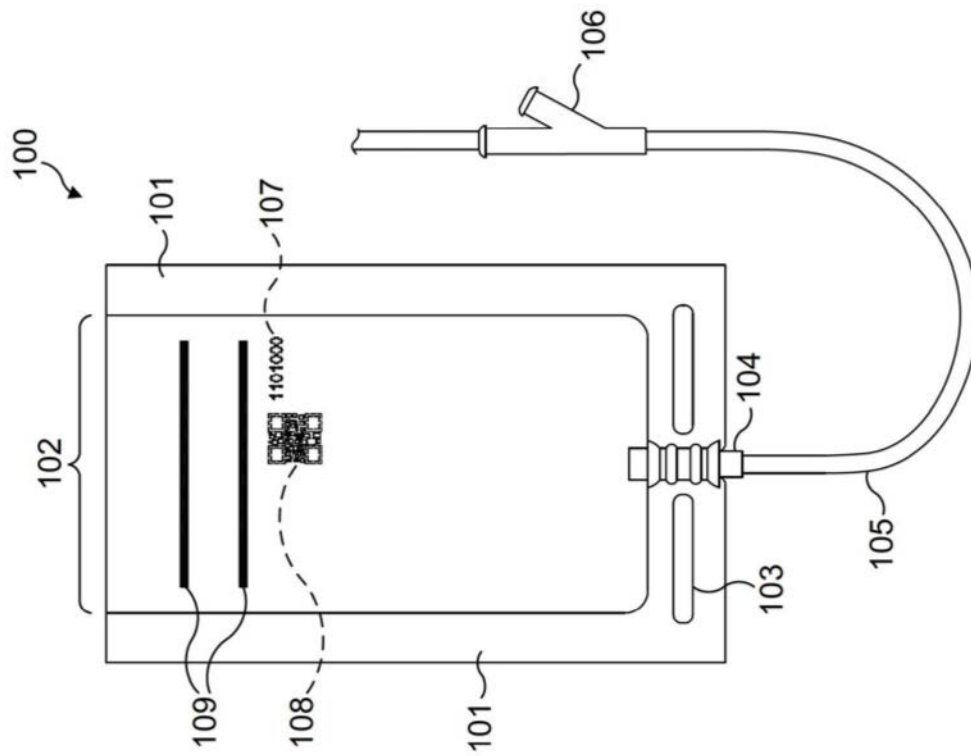


图20D

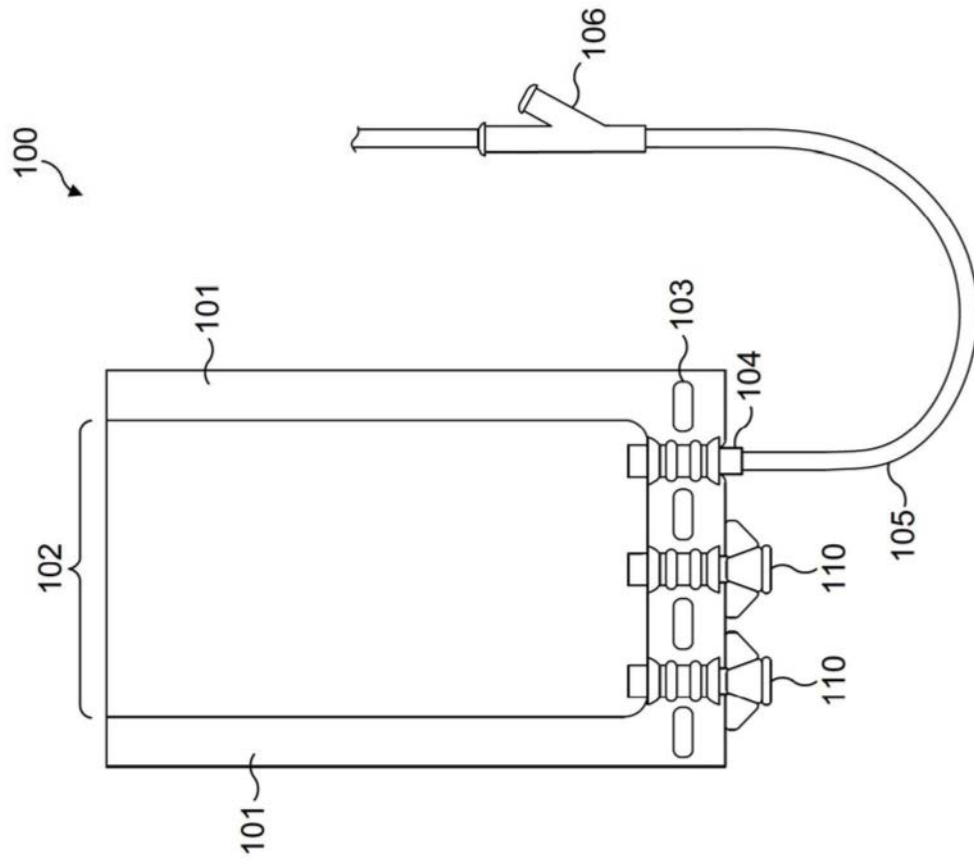


图20E

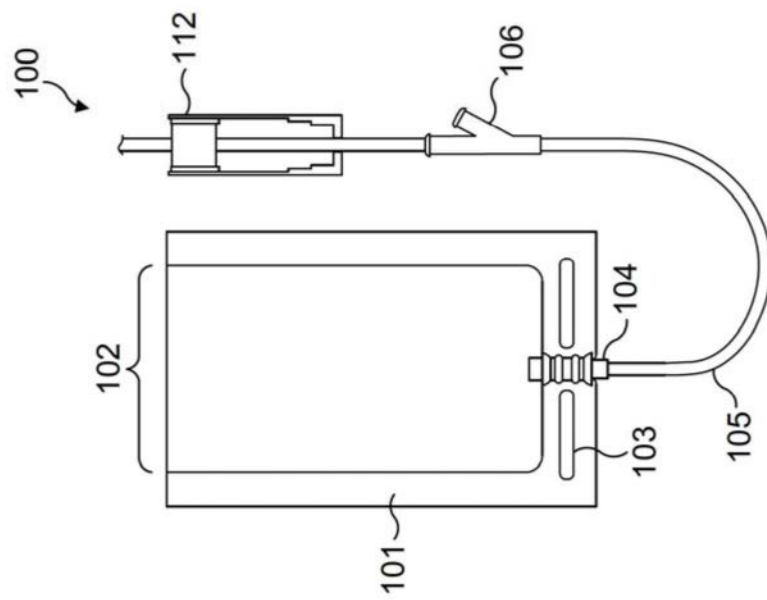


图21A

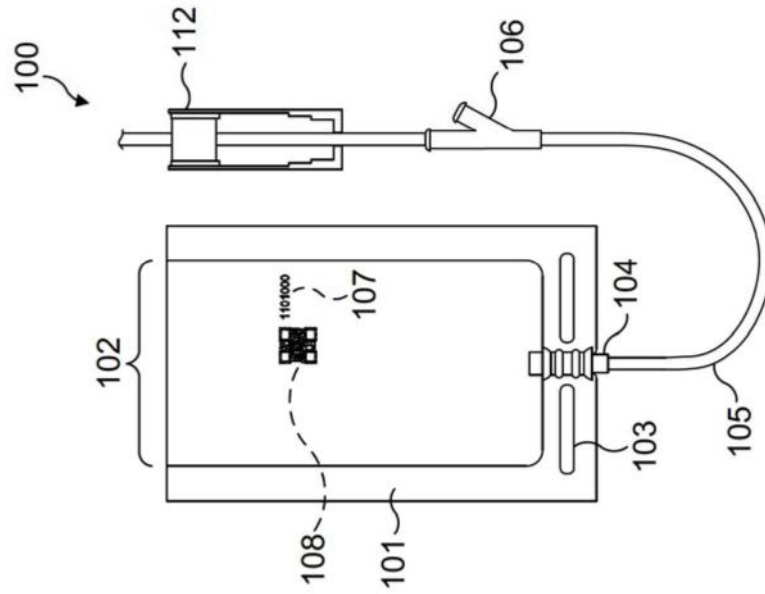


图21B

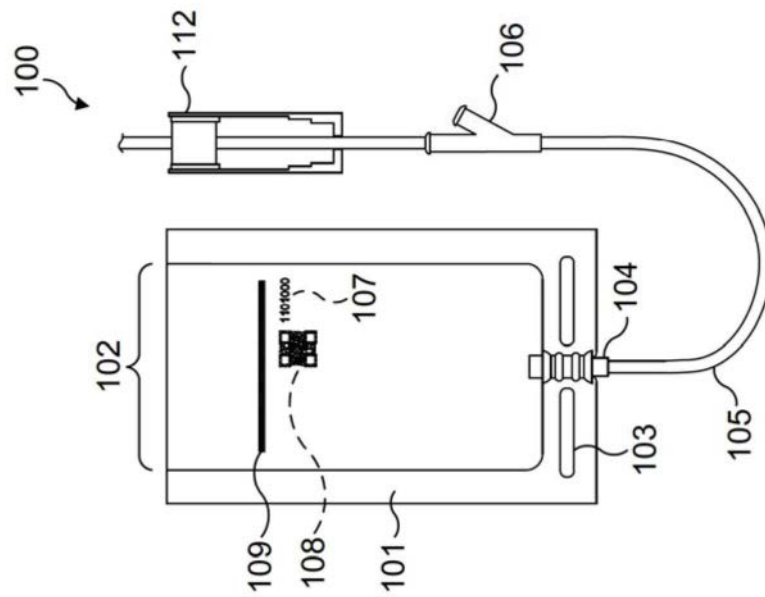


图21C

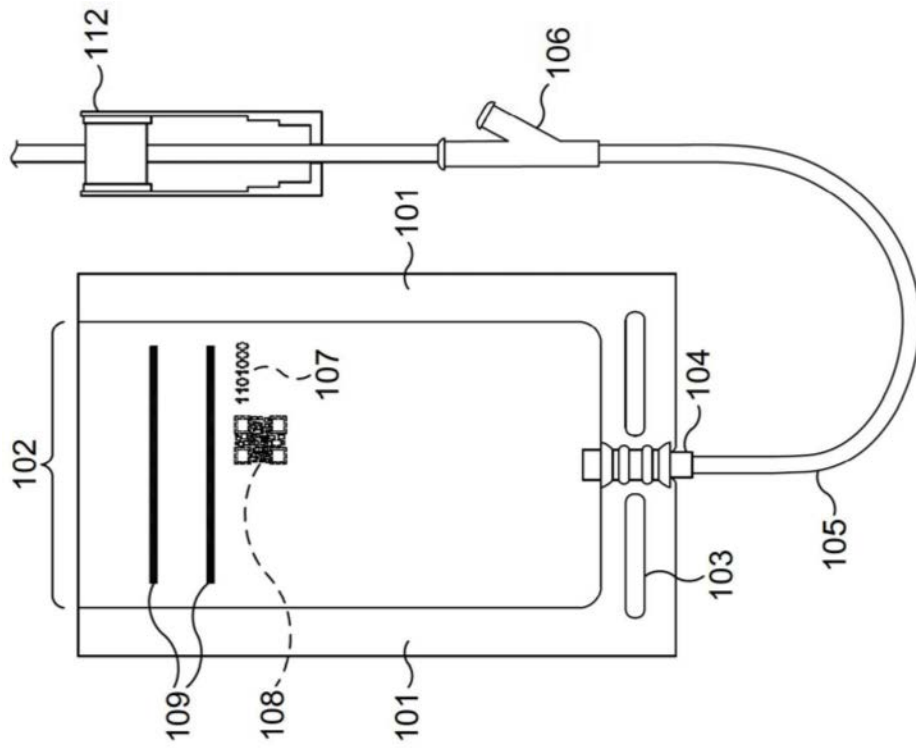


图21D

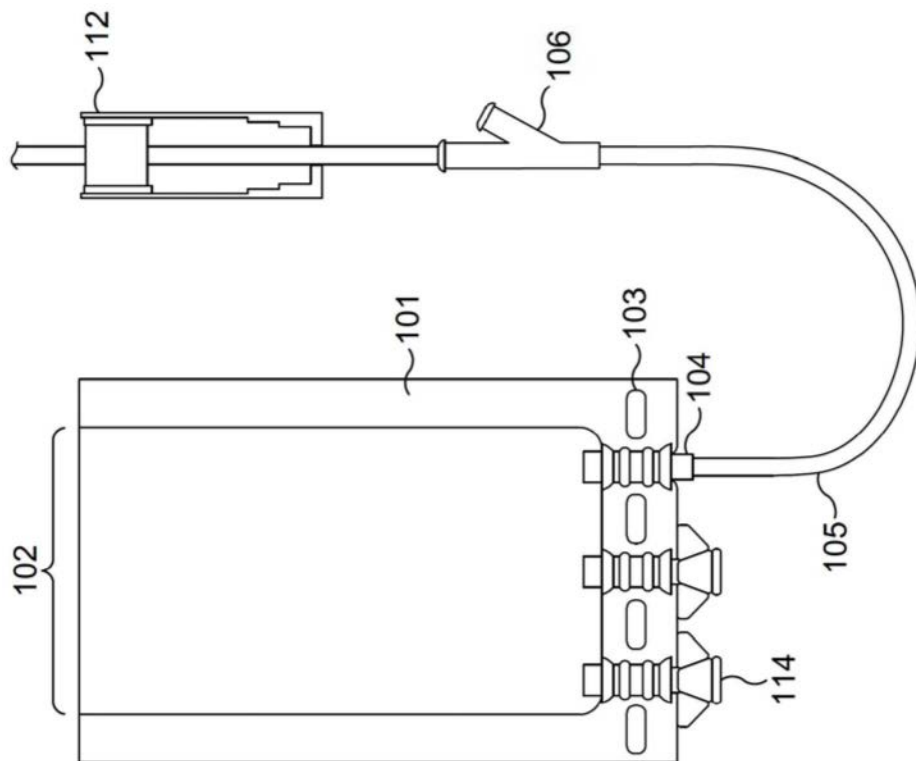


图21E

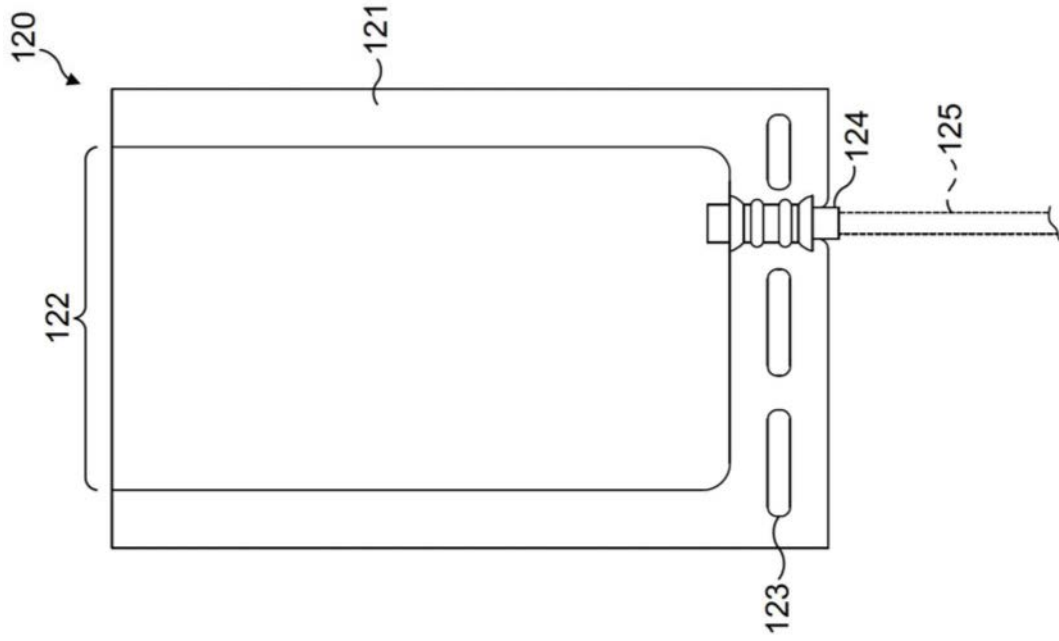


图22A

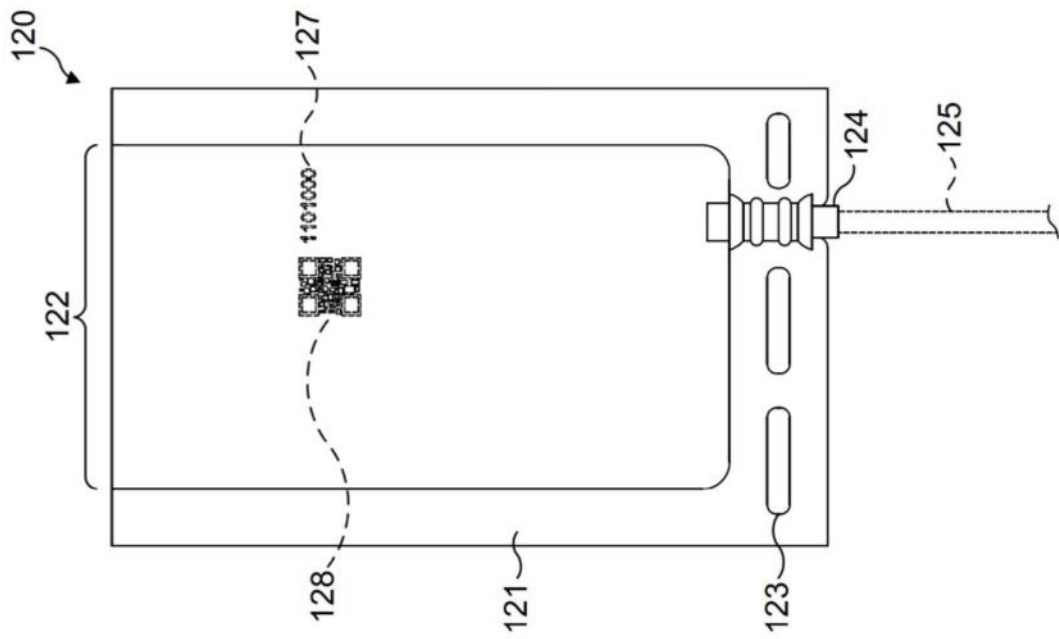


图22B

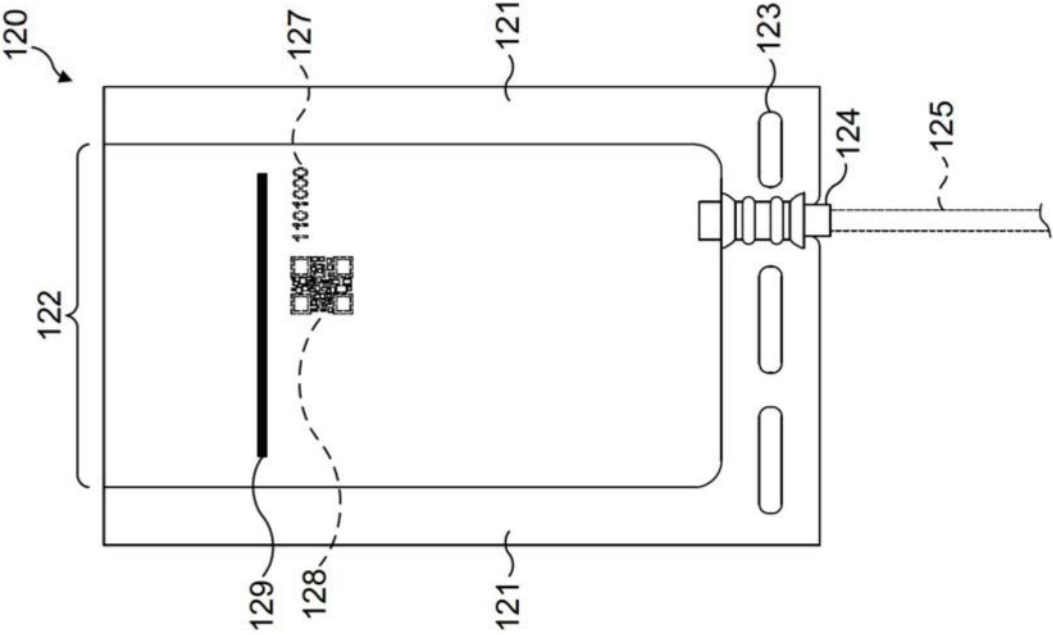


图22C

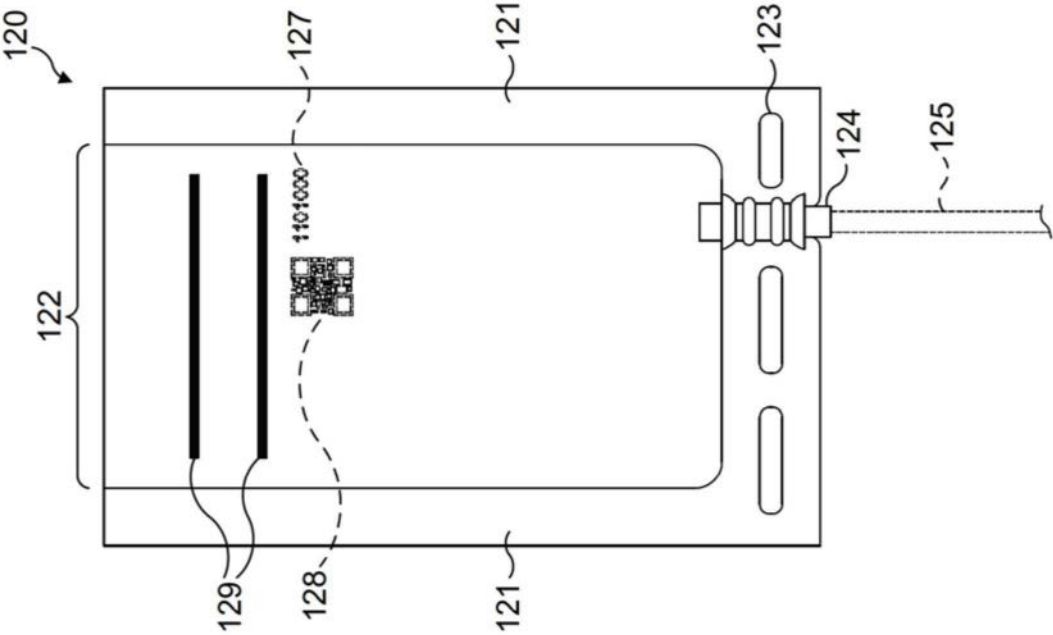


图22D

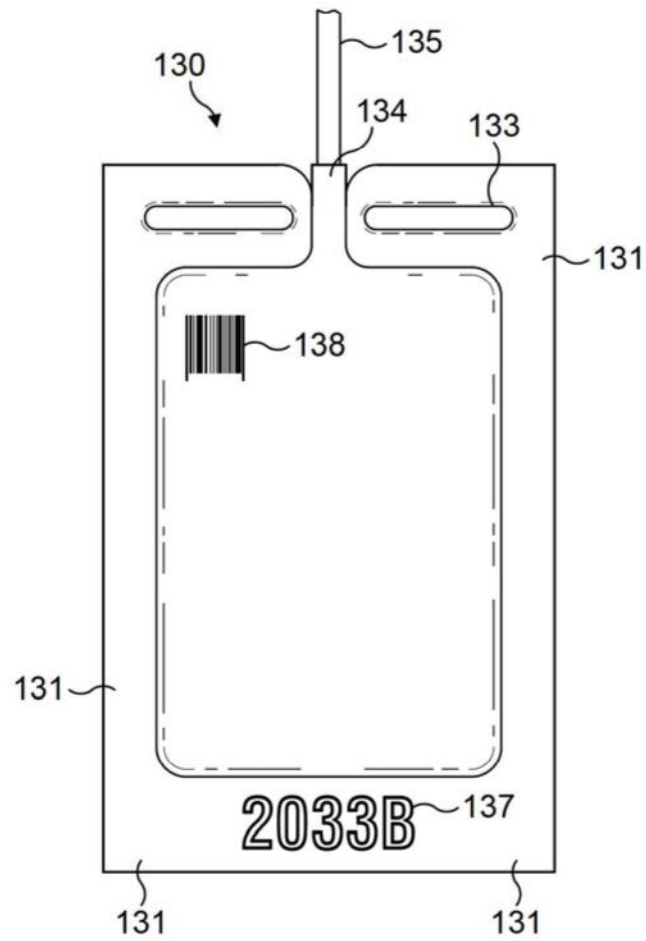


图23

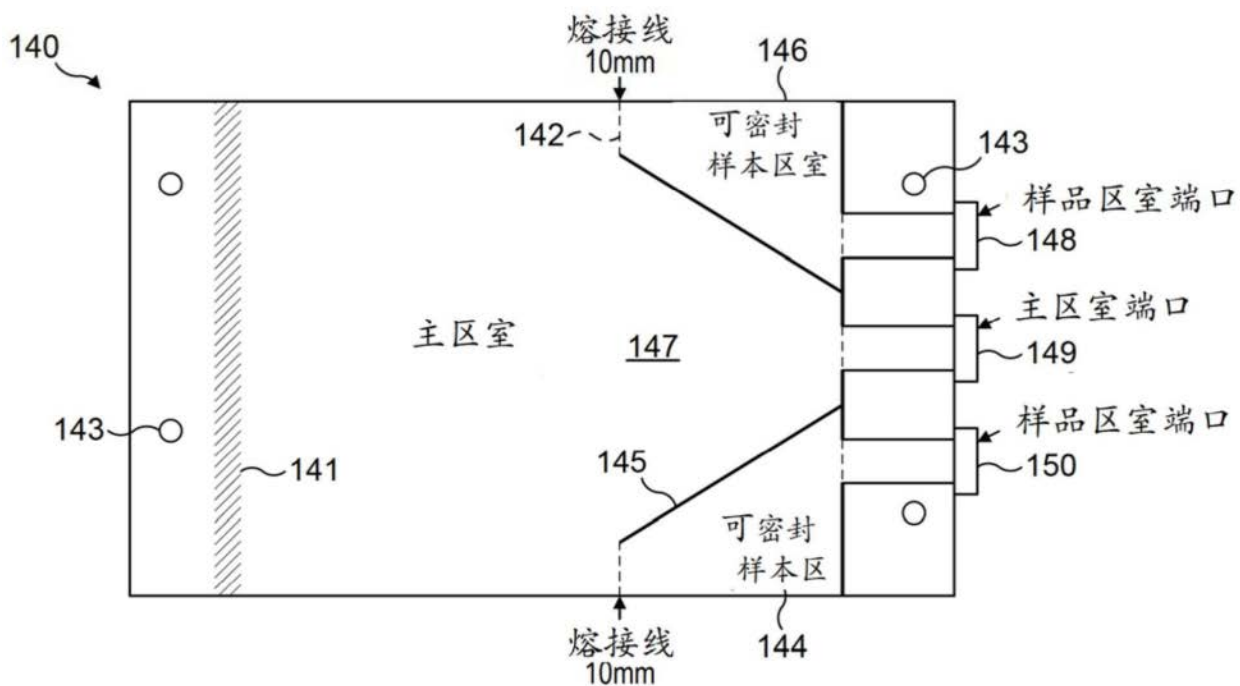


图24

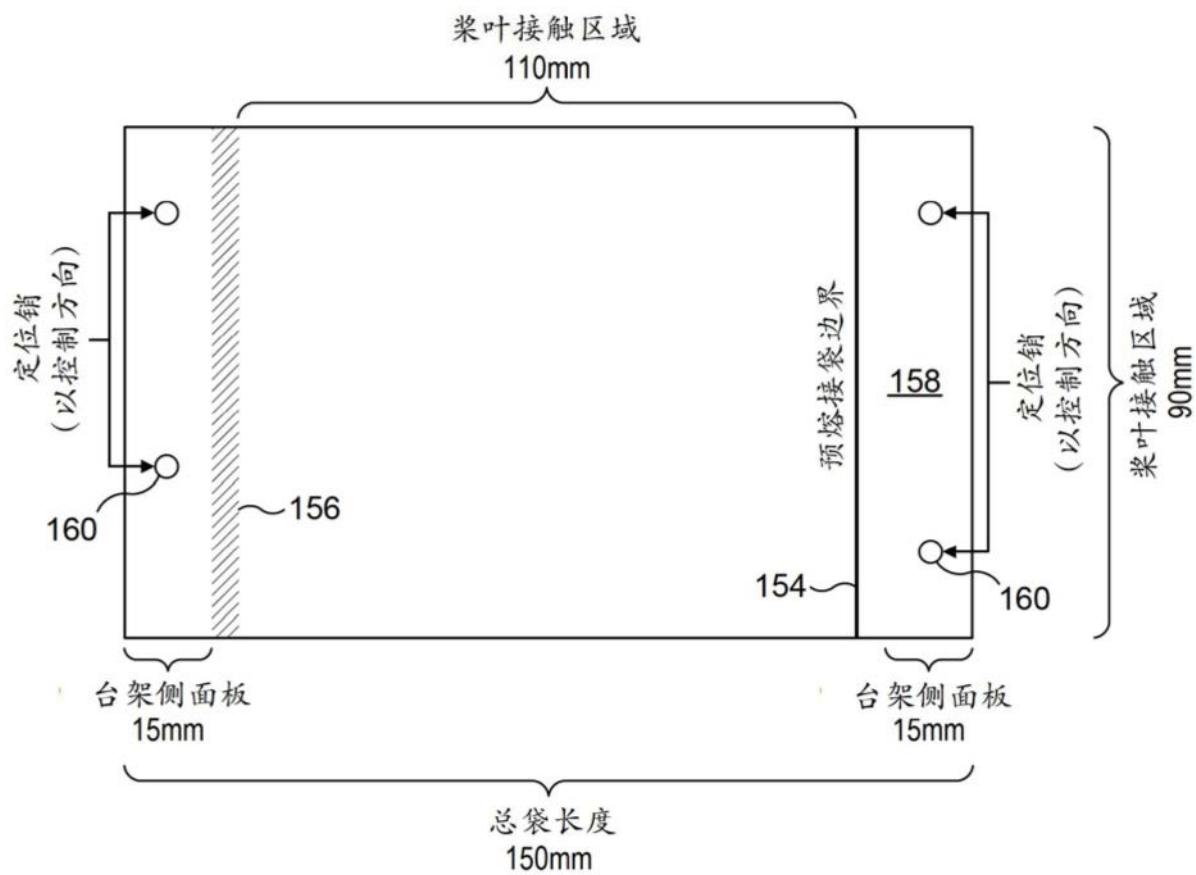


图25

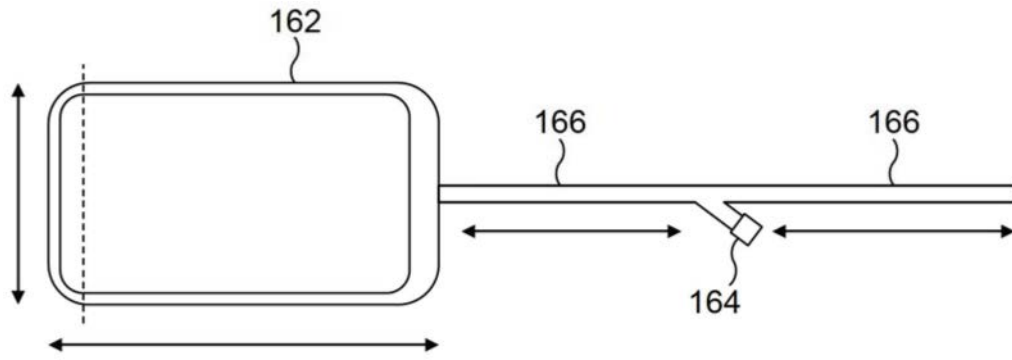


图26

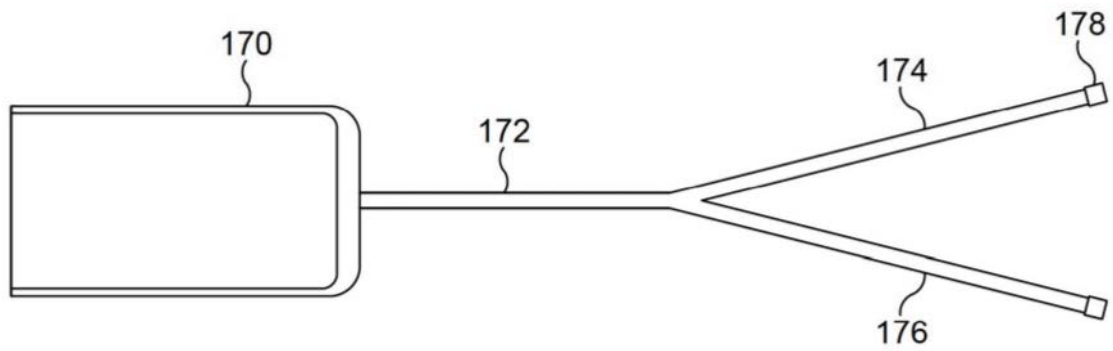


图27A

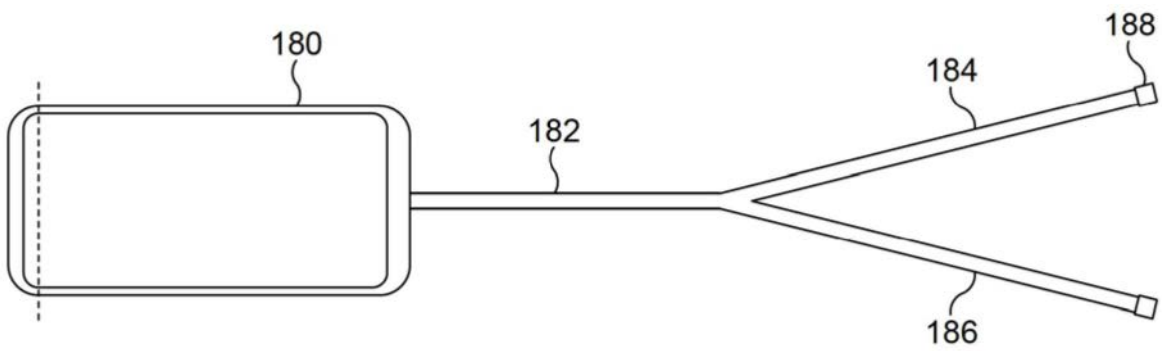


图27B

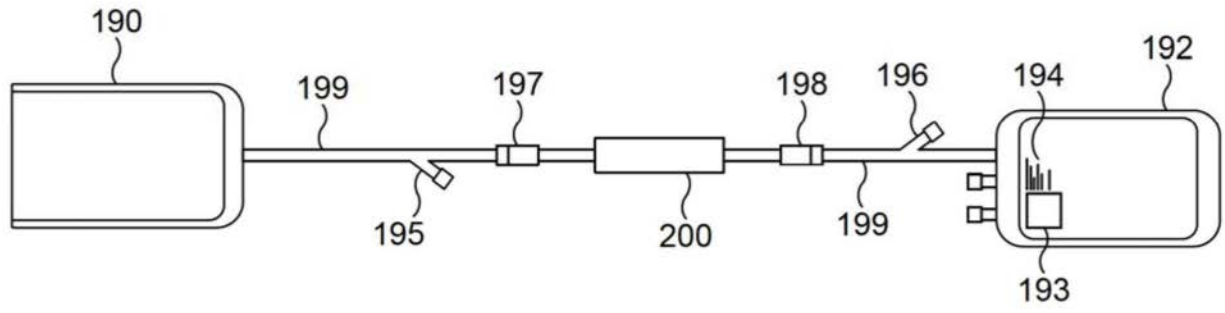


图28

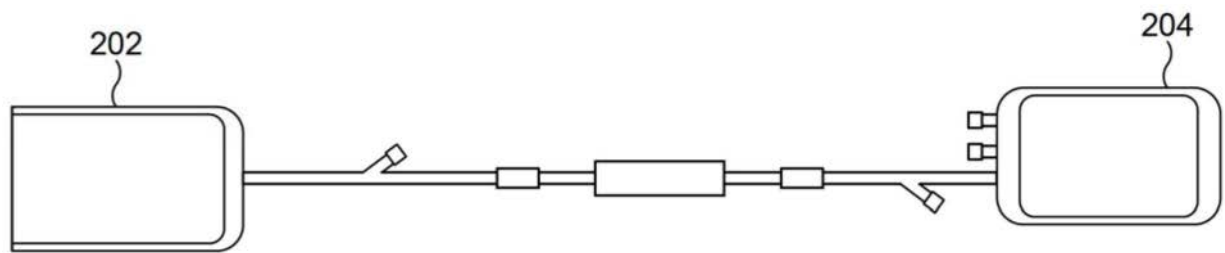


图29

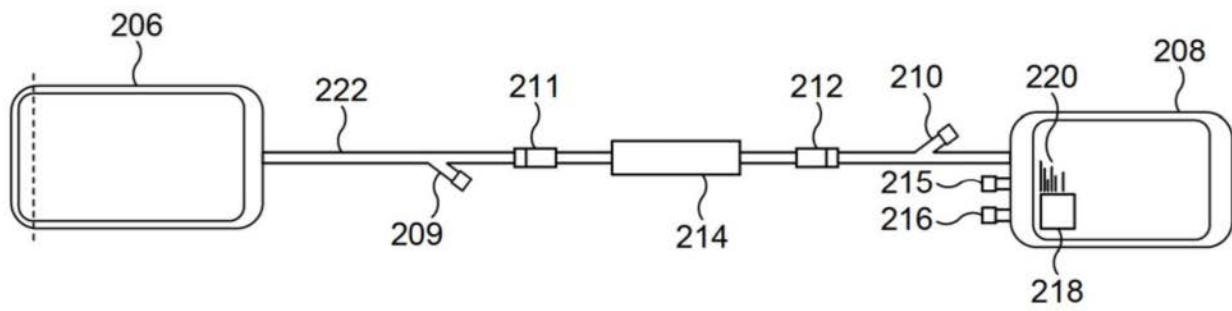


图30

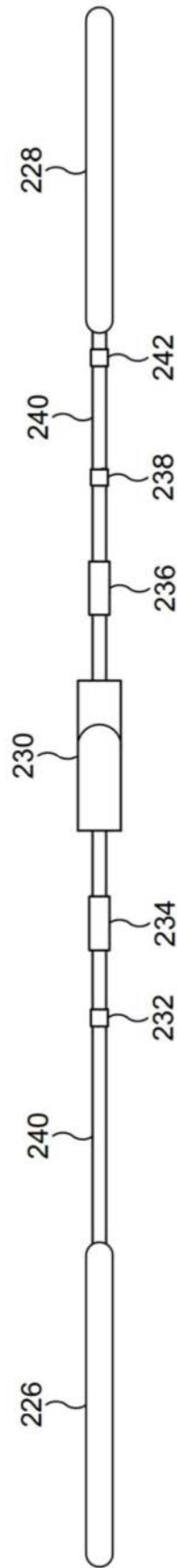


图31

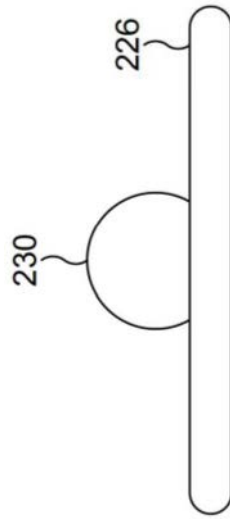


图32

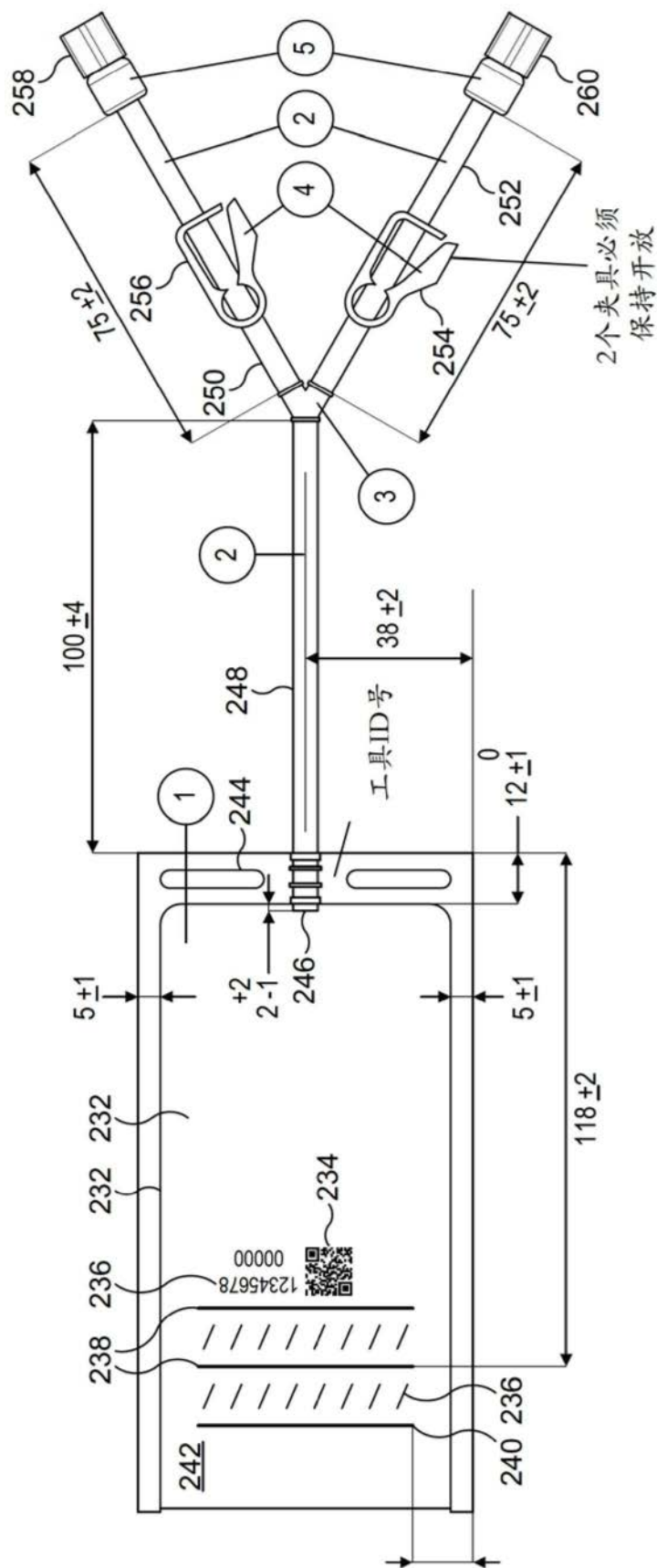


图33

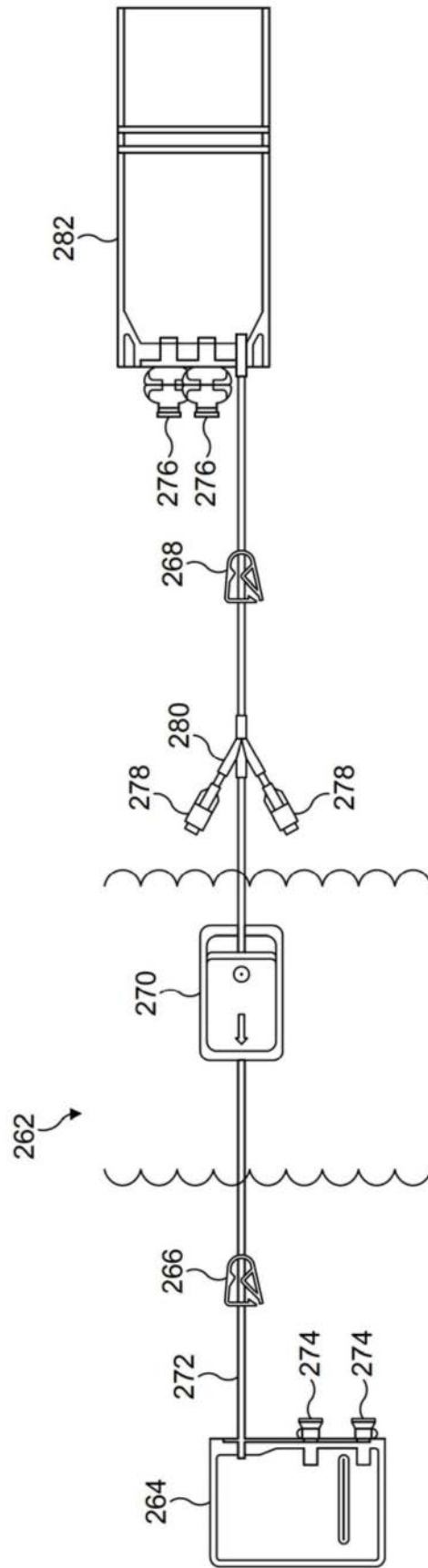


图34

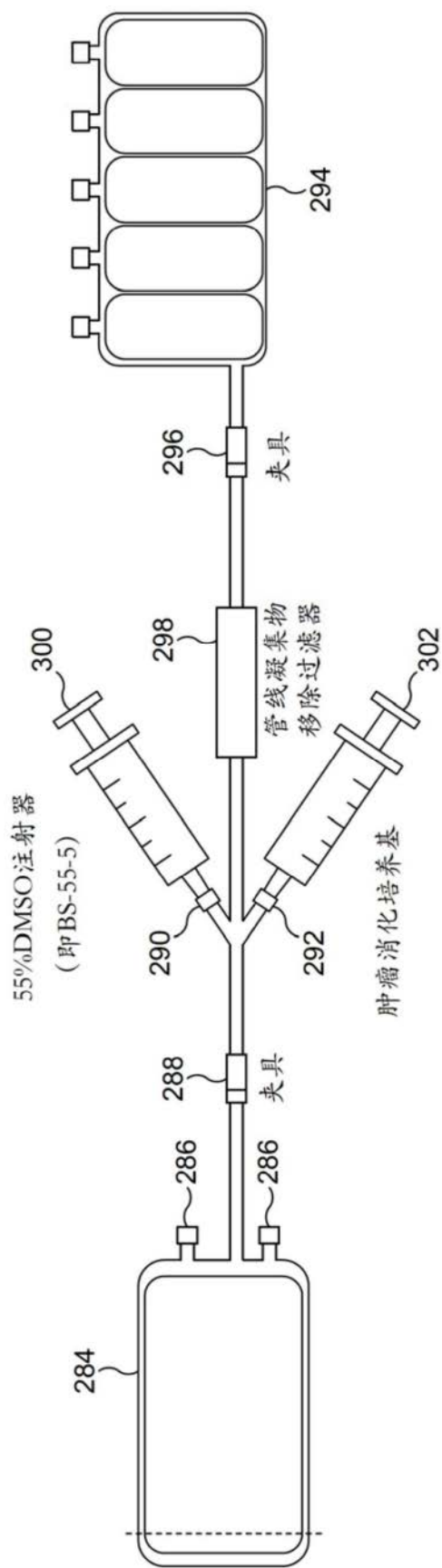


图35

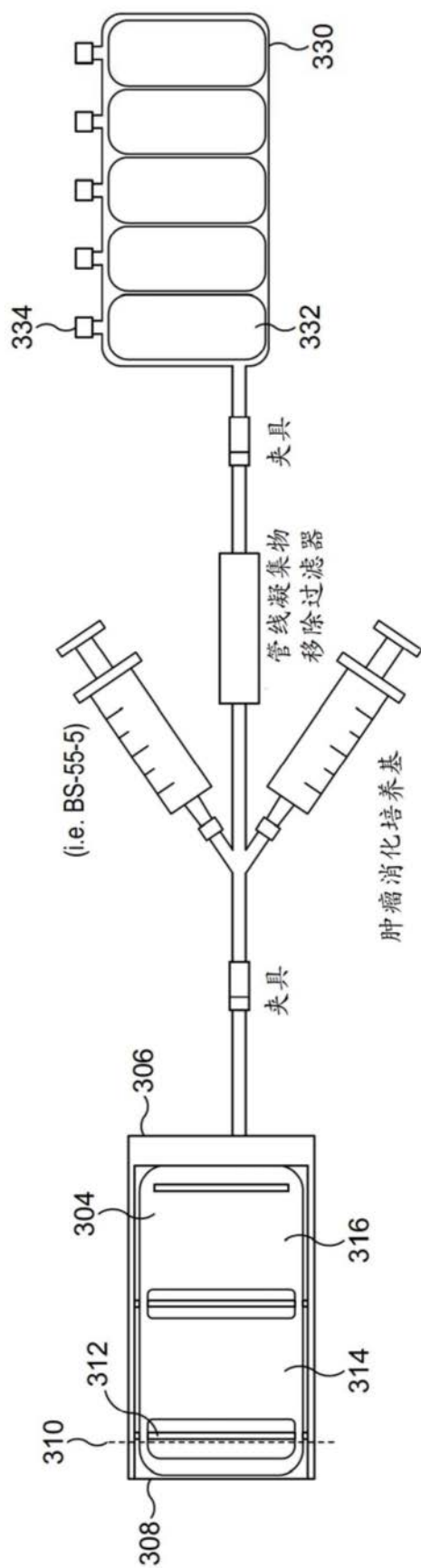


图36A

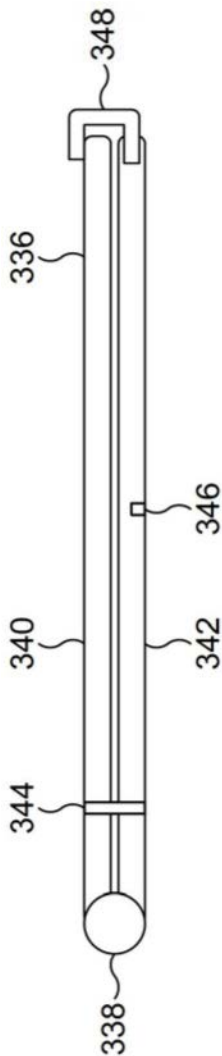


图36B

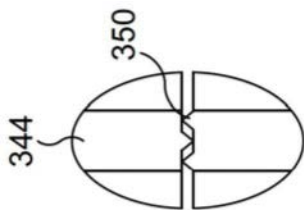


图36C

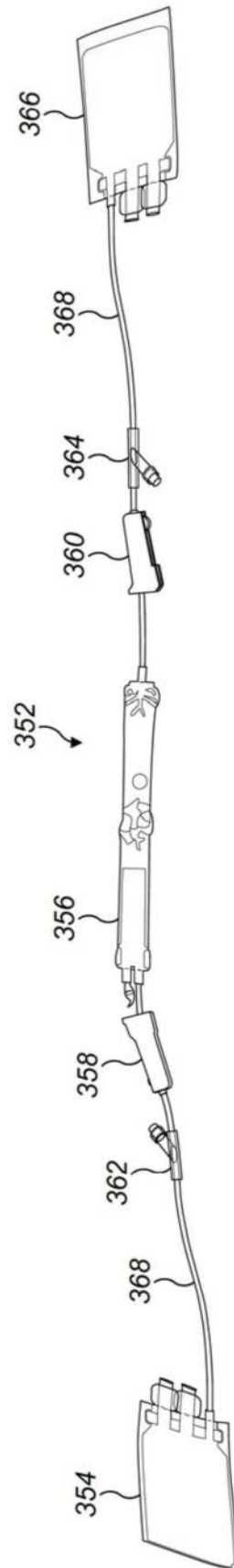


图37

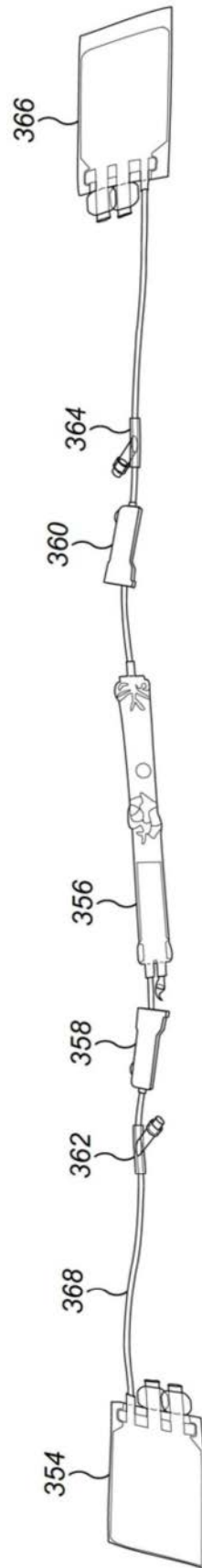


图38

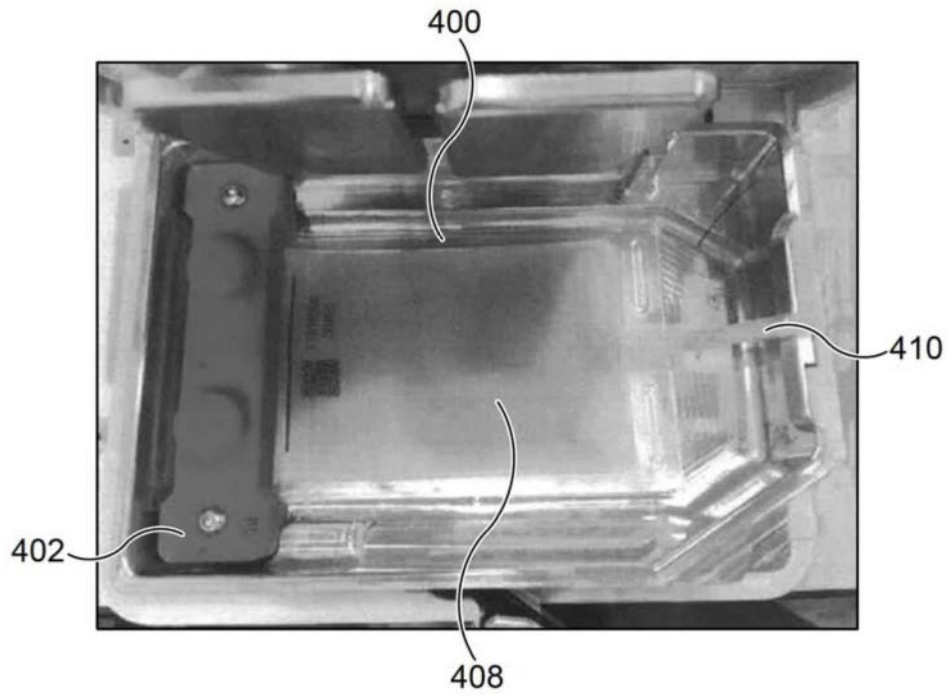


图39

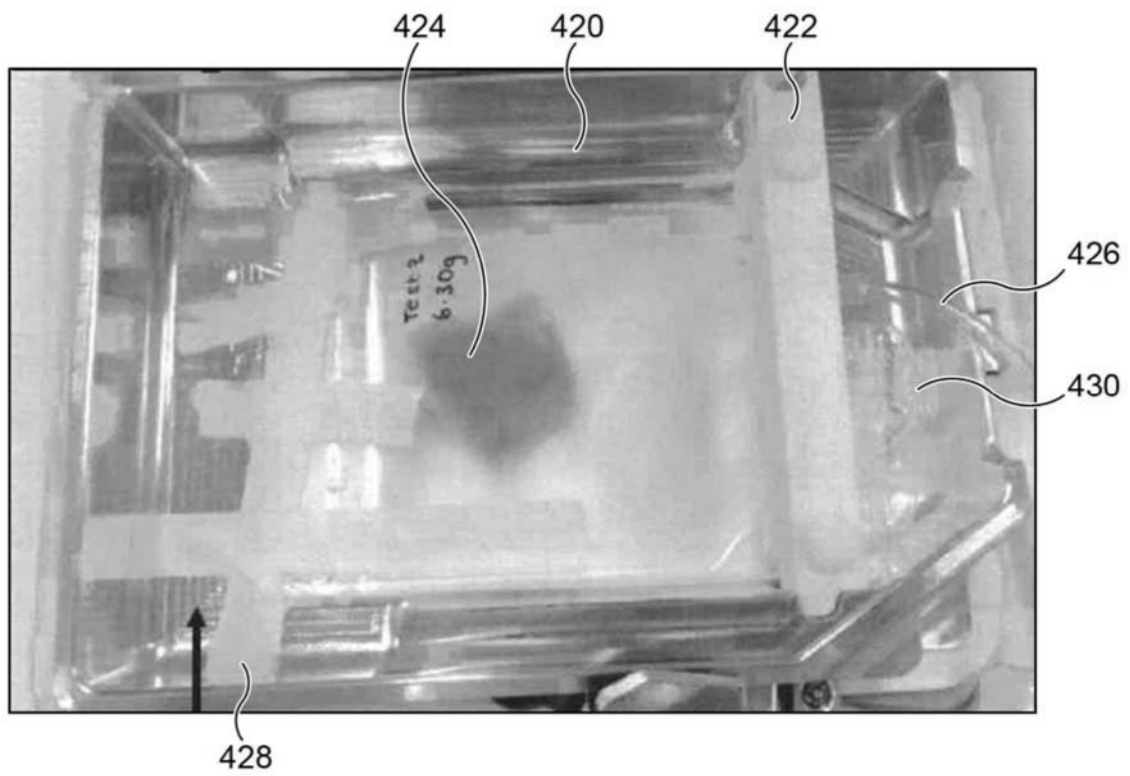


图40

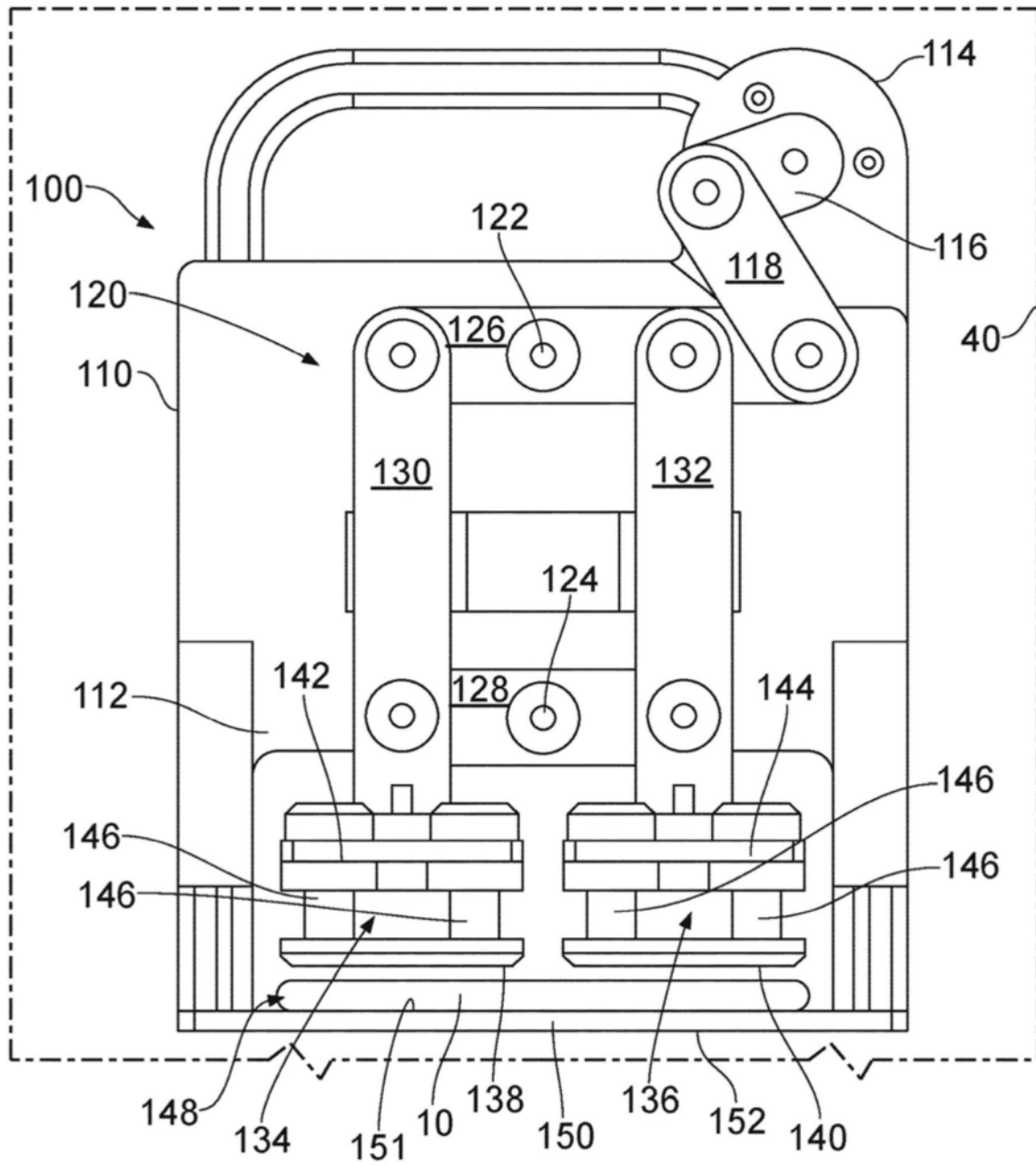


图41

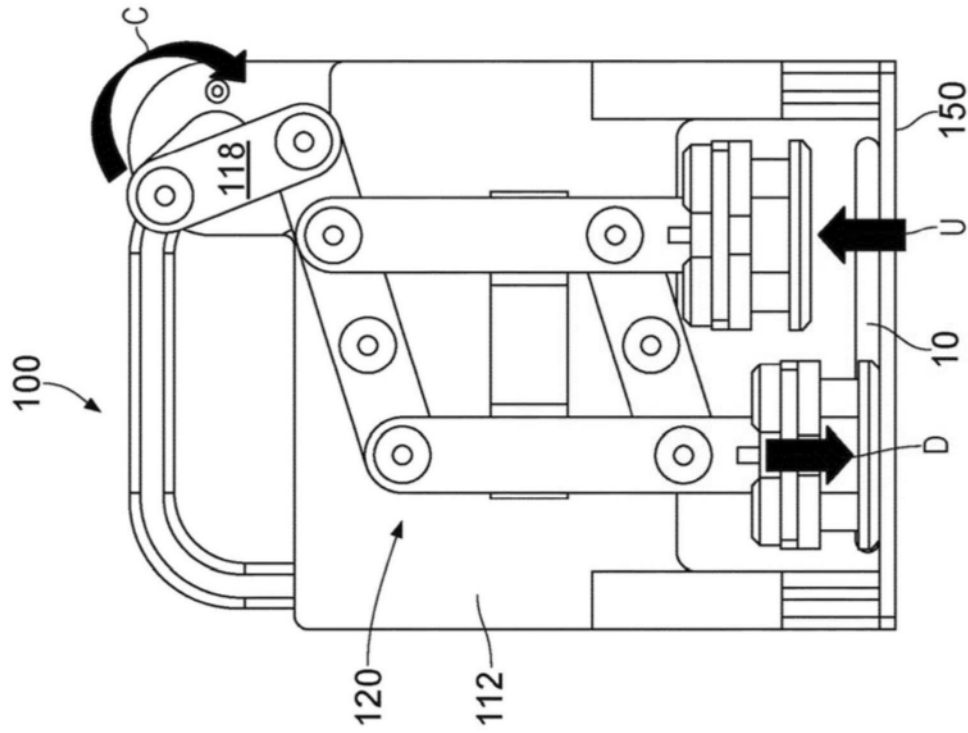


图42

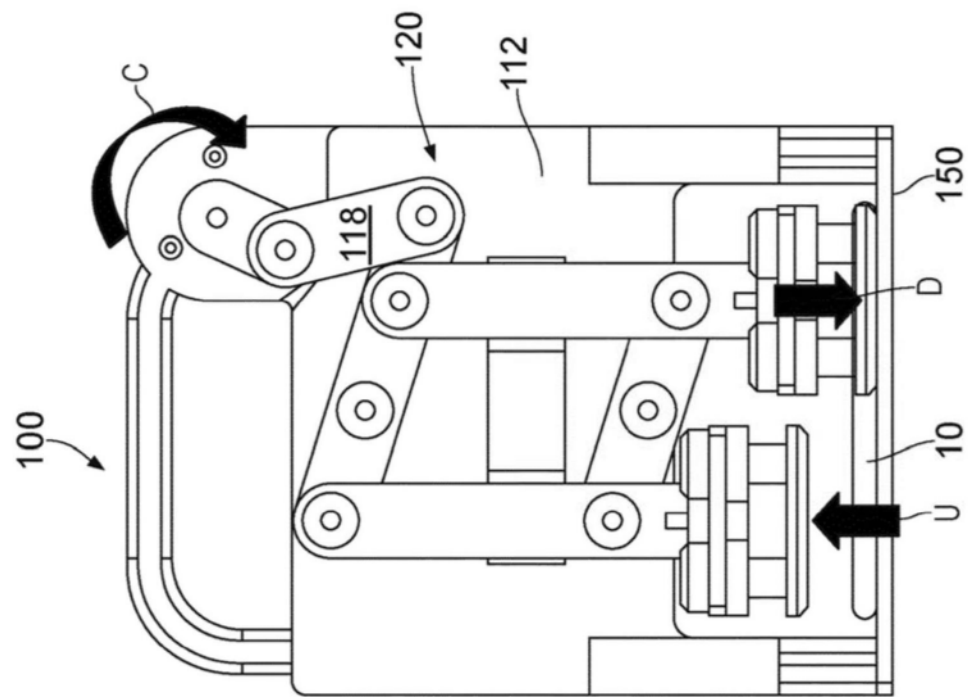


图43

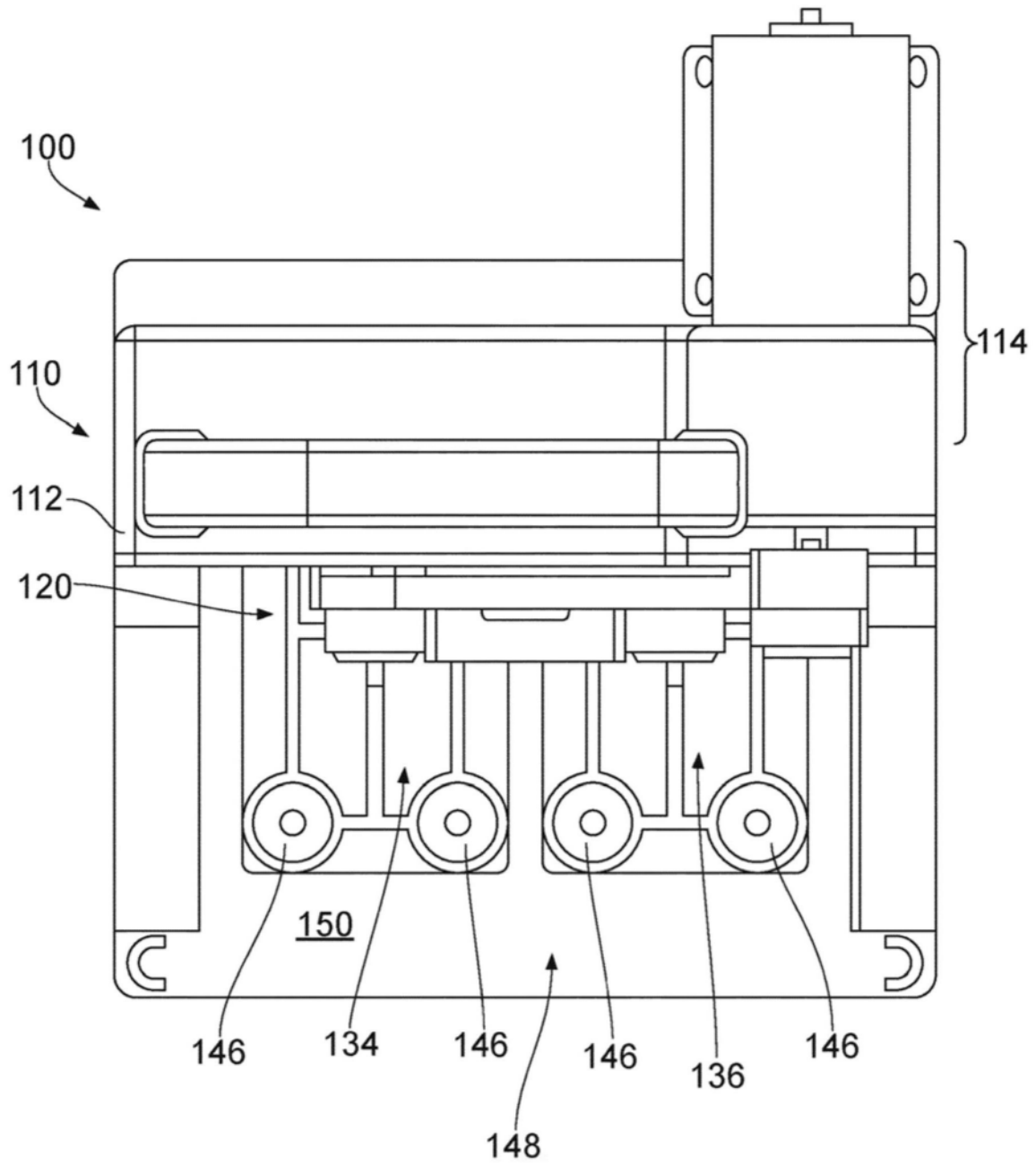


图44

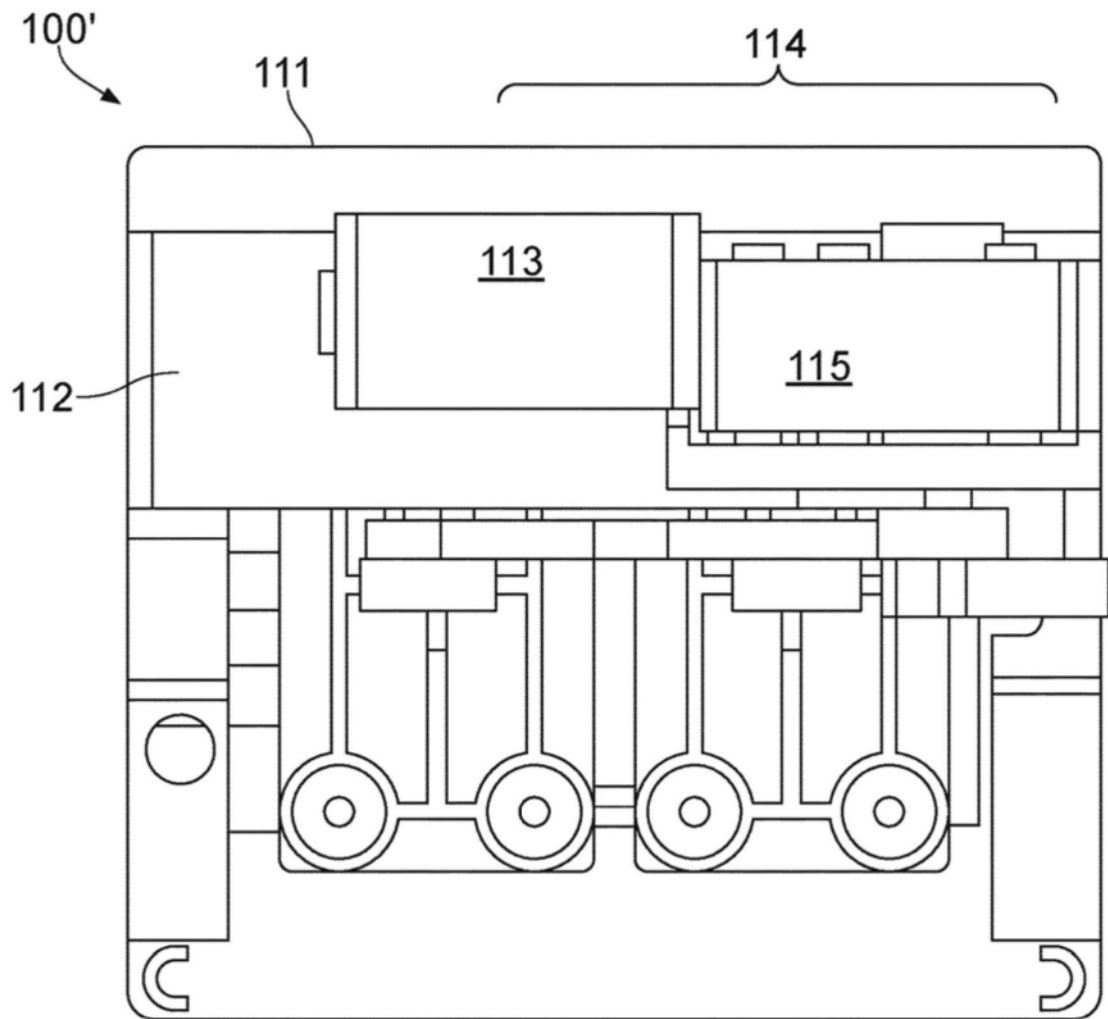


图45

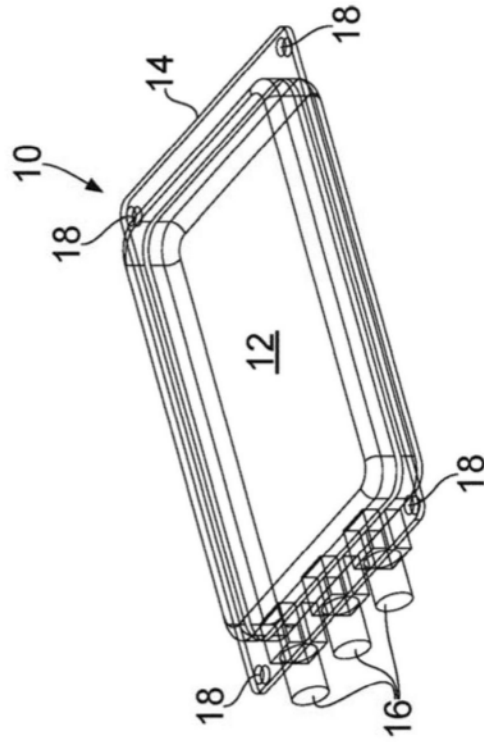


图46

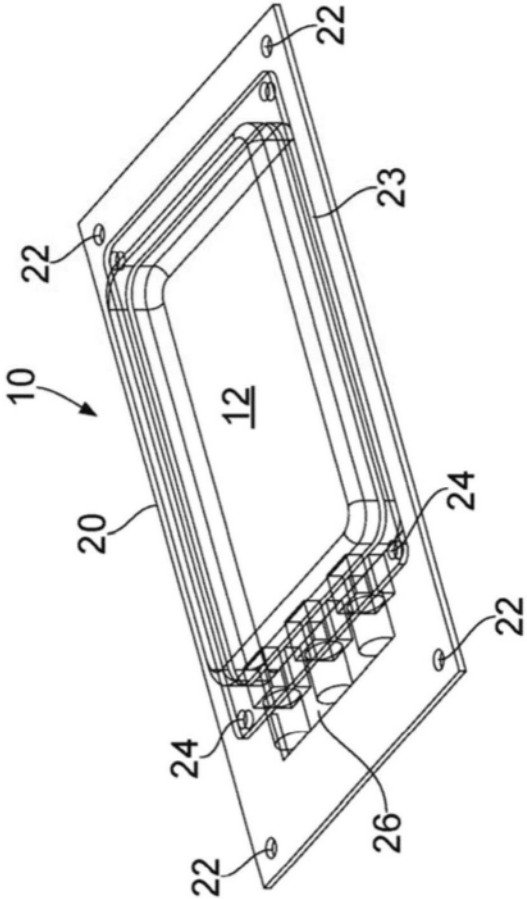


图47

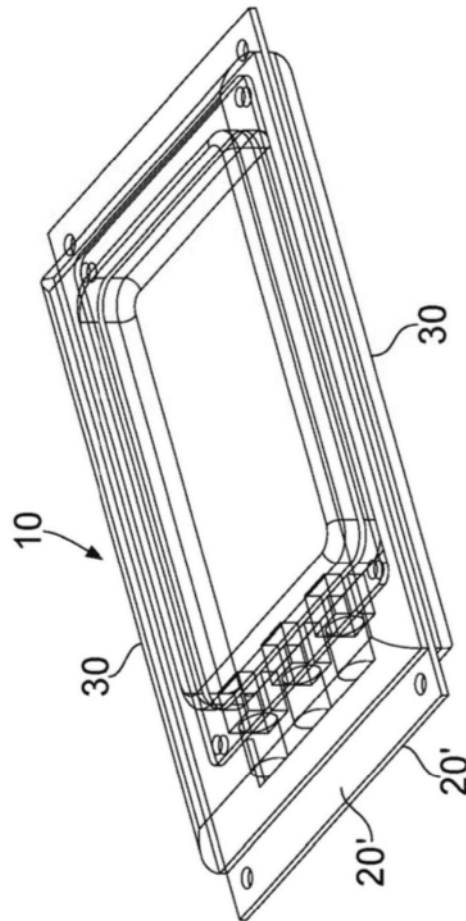


图48

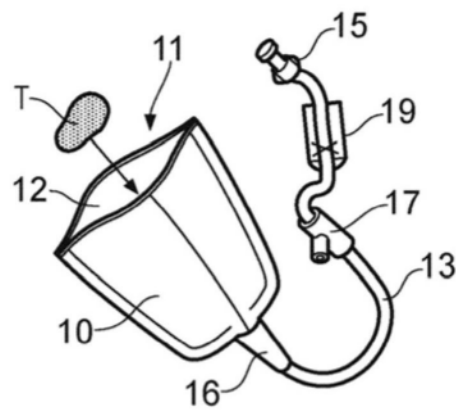


图49

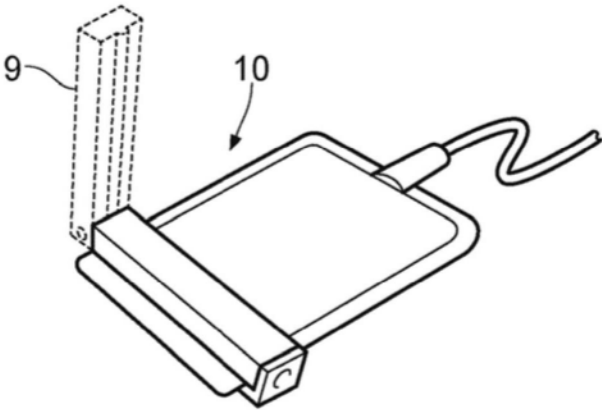


图50

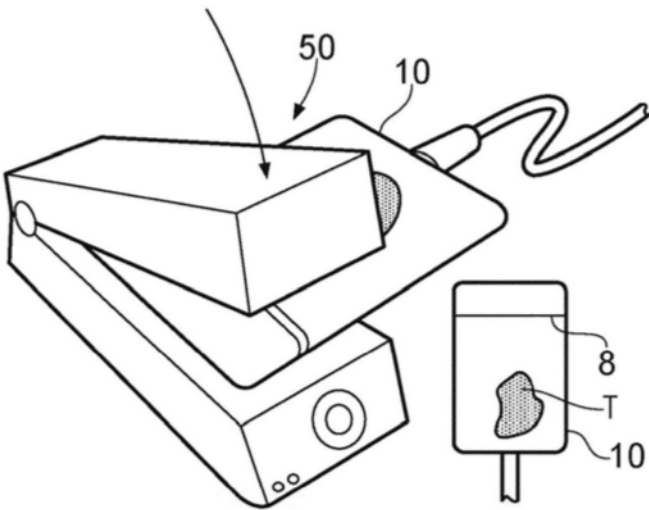


图51A

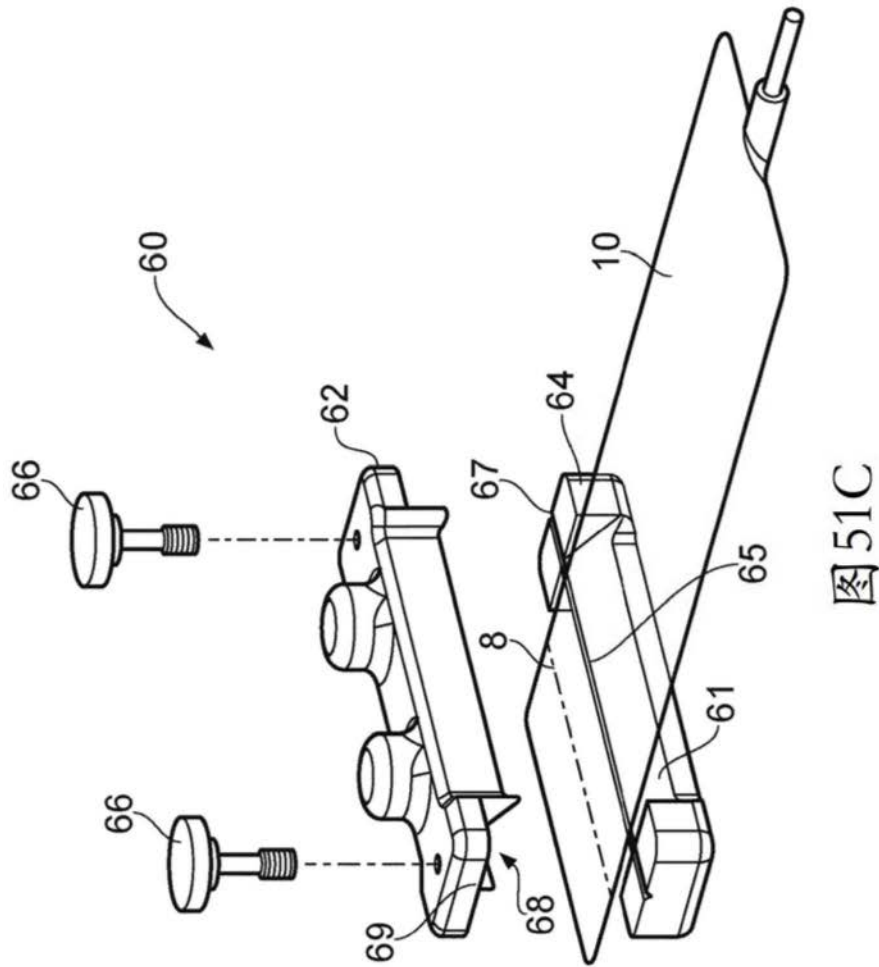


图51C

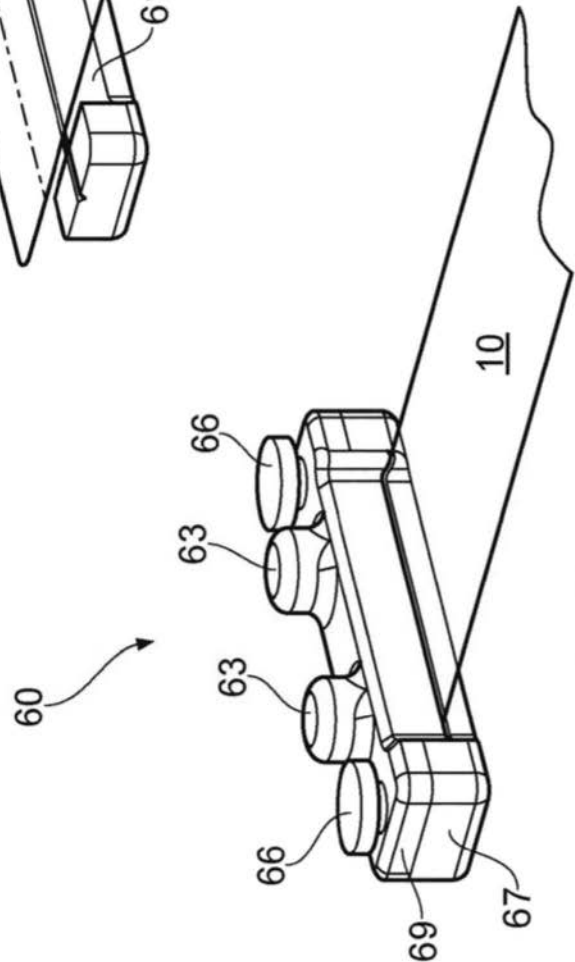


图51B

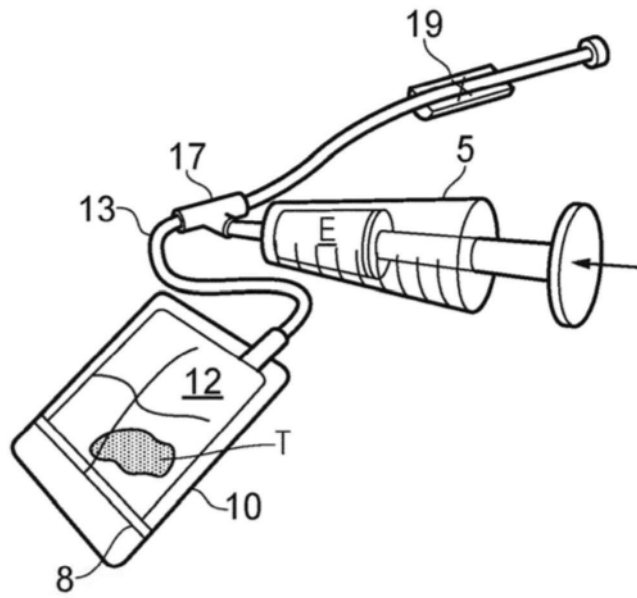


图52

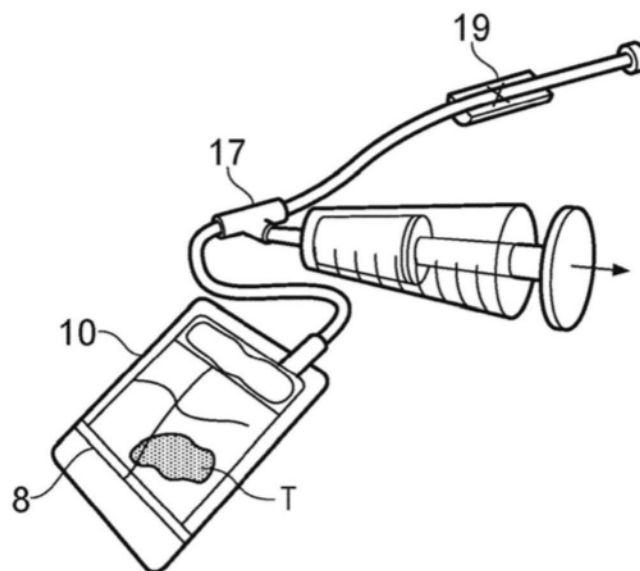


图53

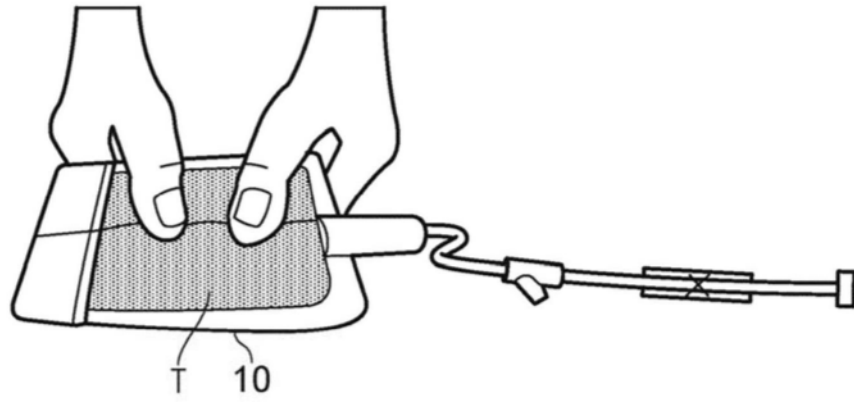


图54

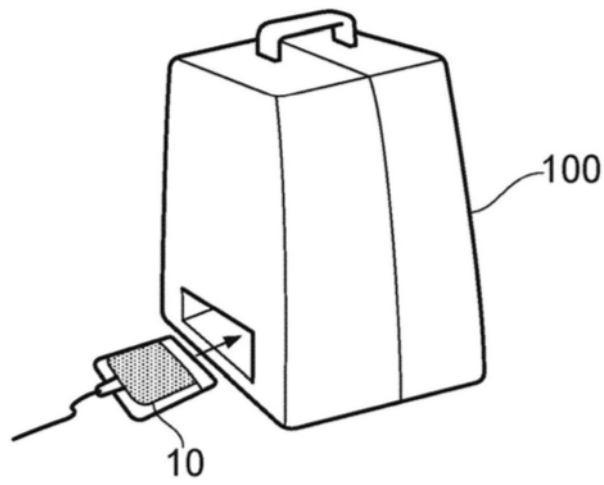


图55

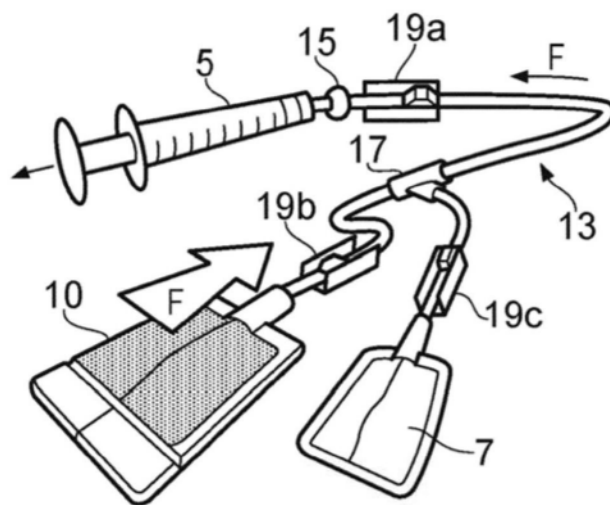


图56

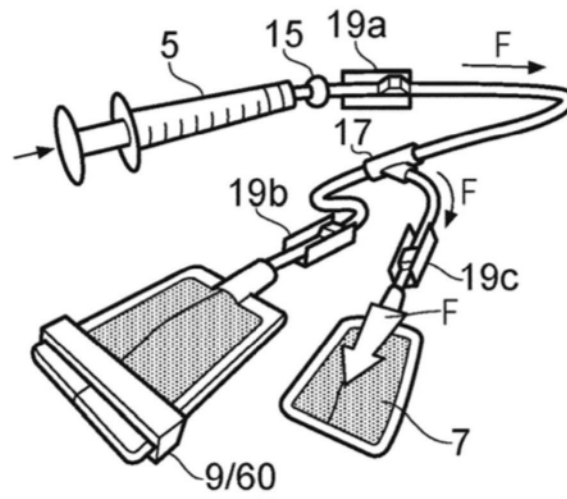


图57

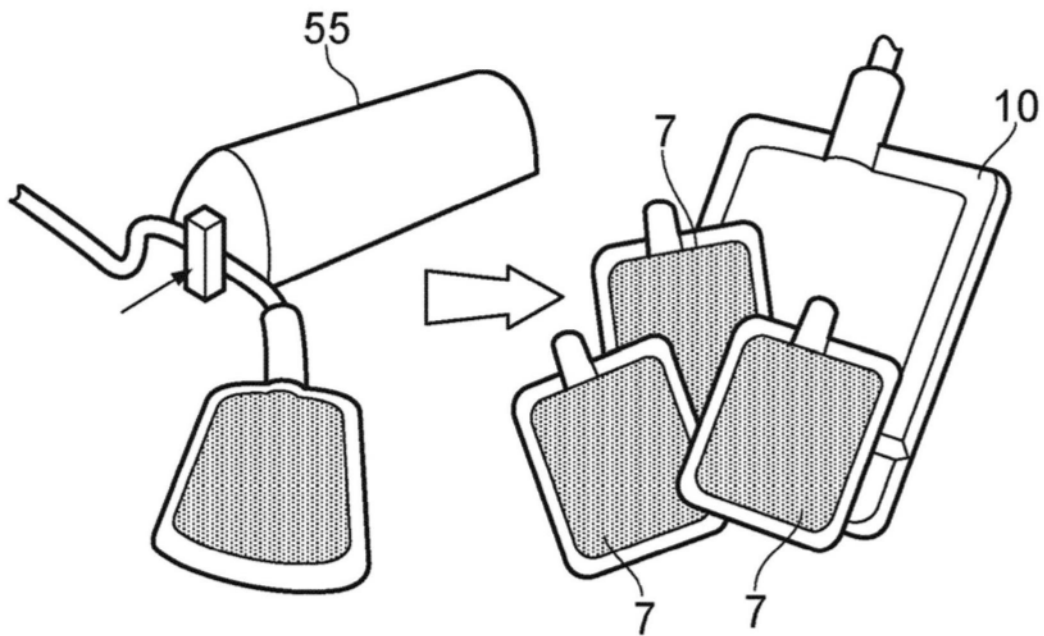


图58

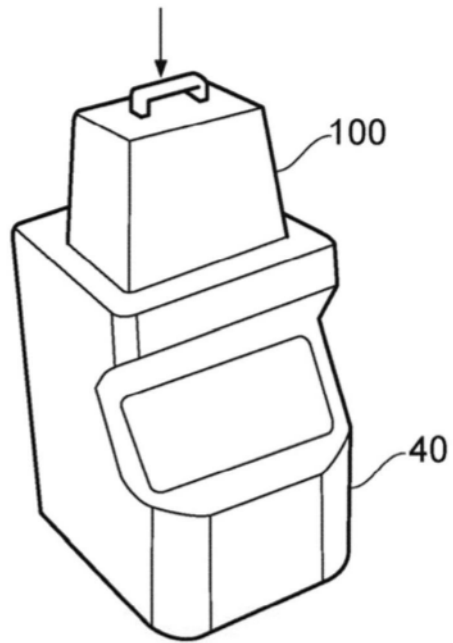


图59

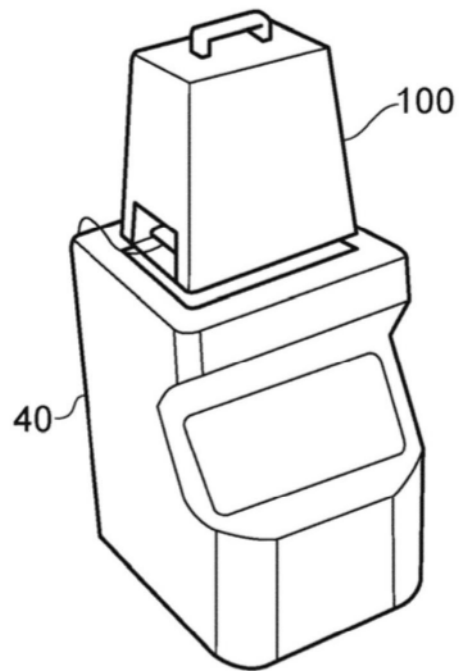


图60

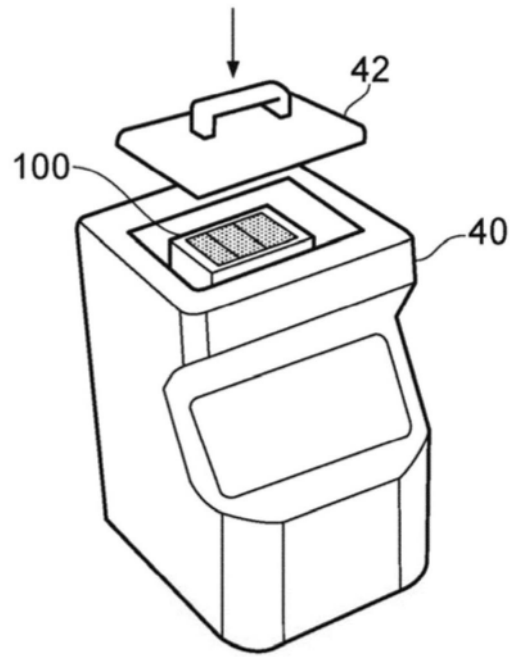


图61

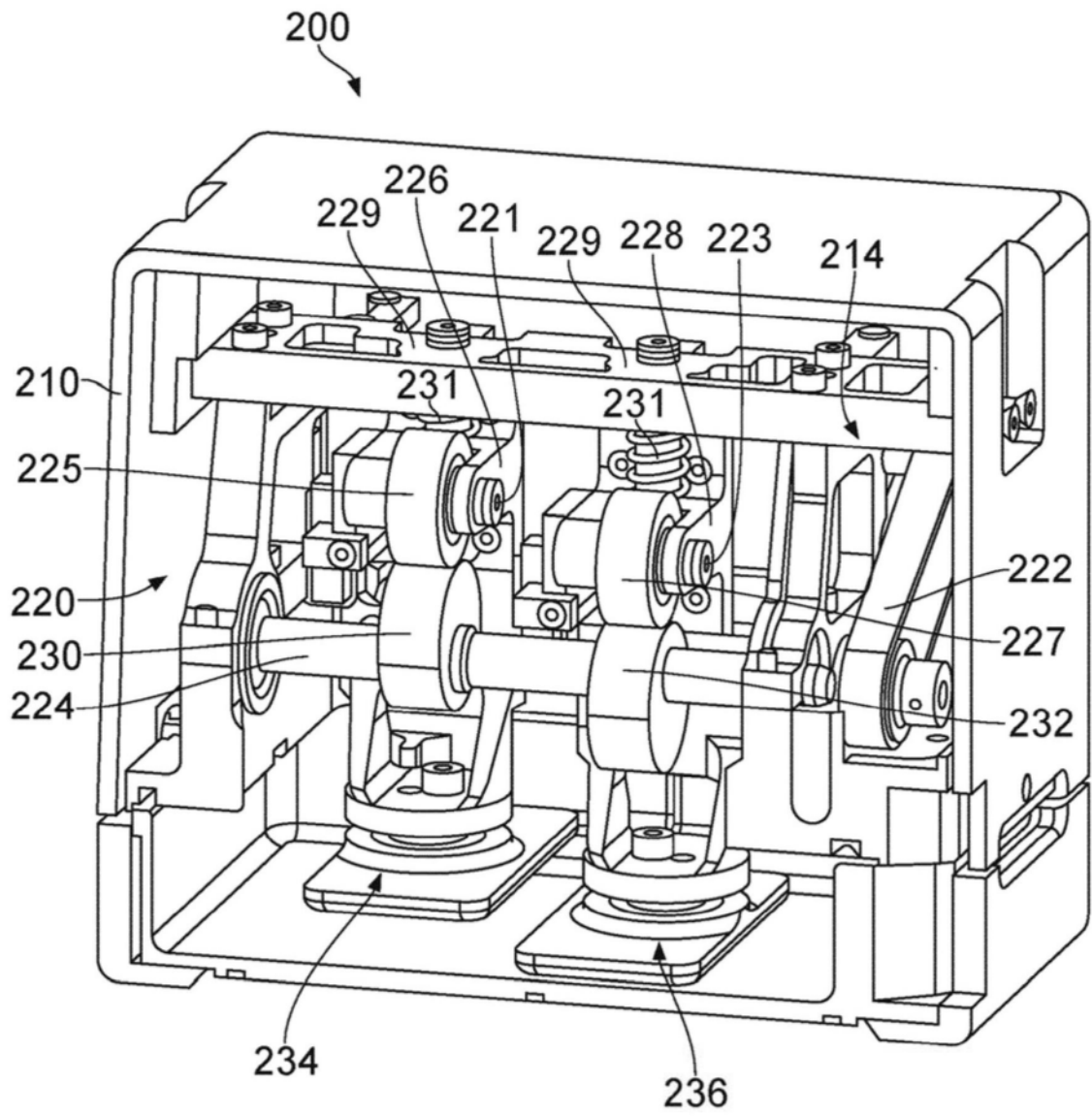


图62

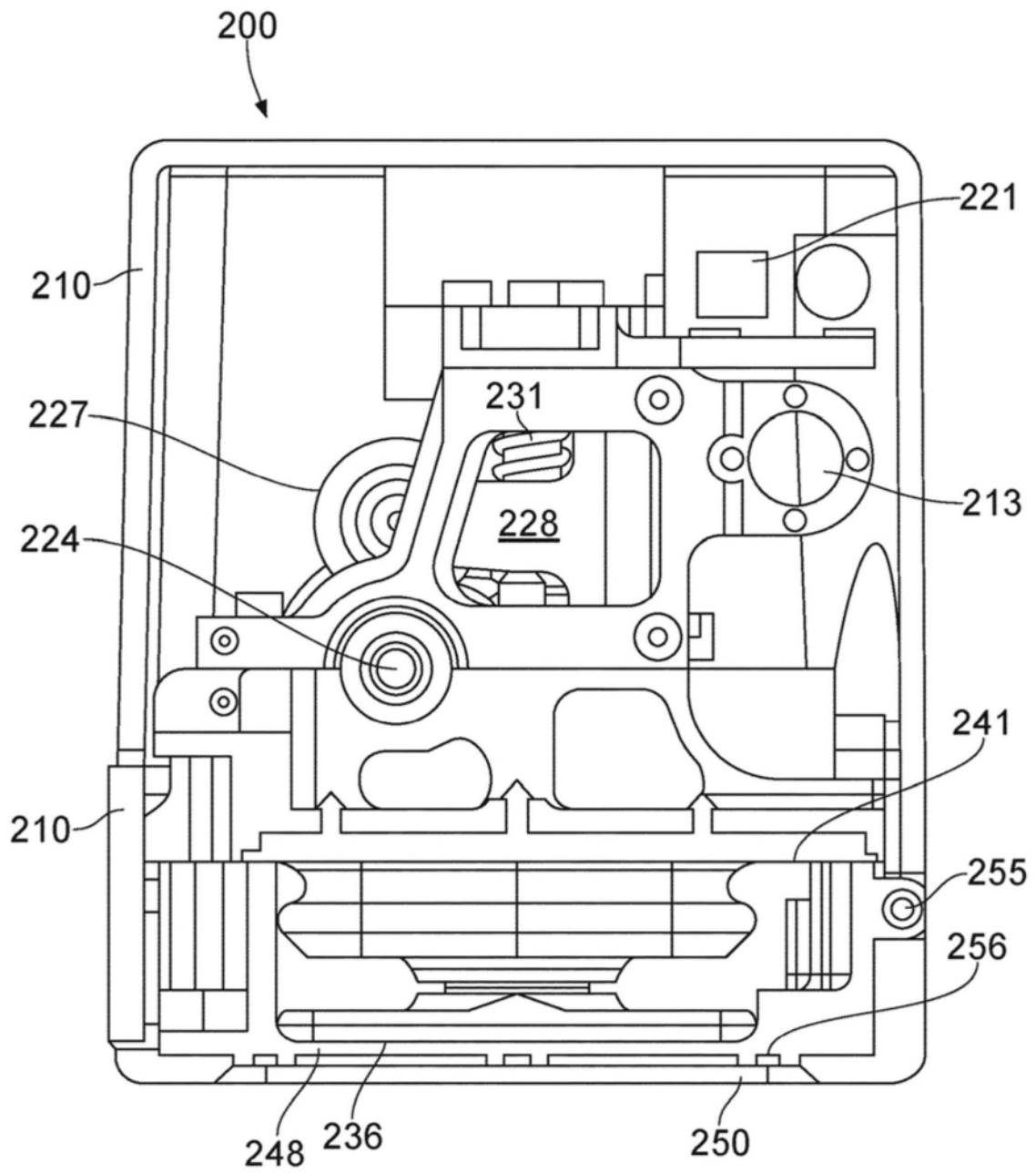


图63

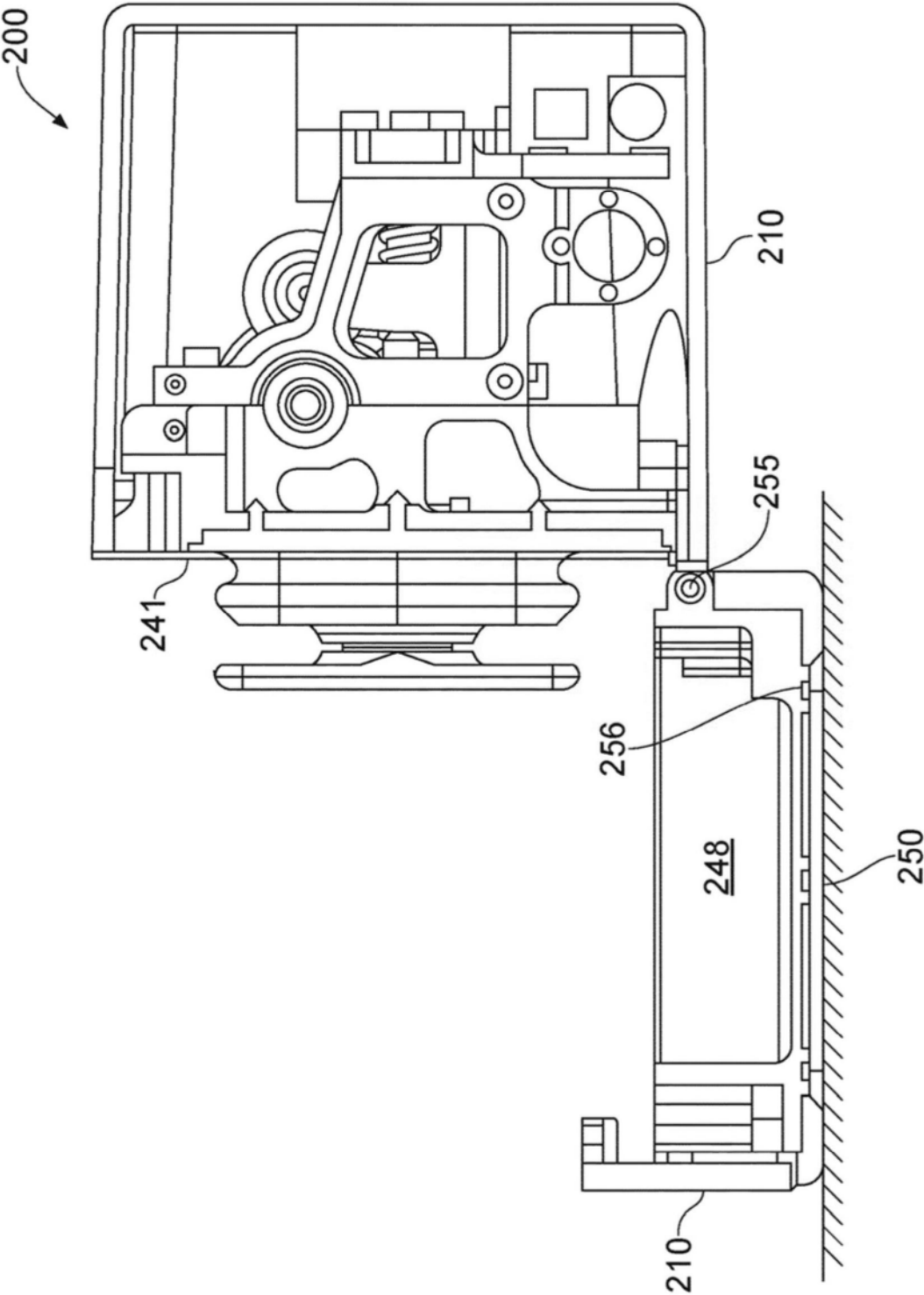


图64



图65

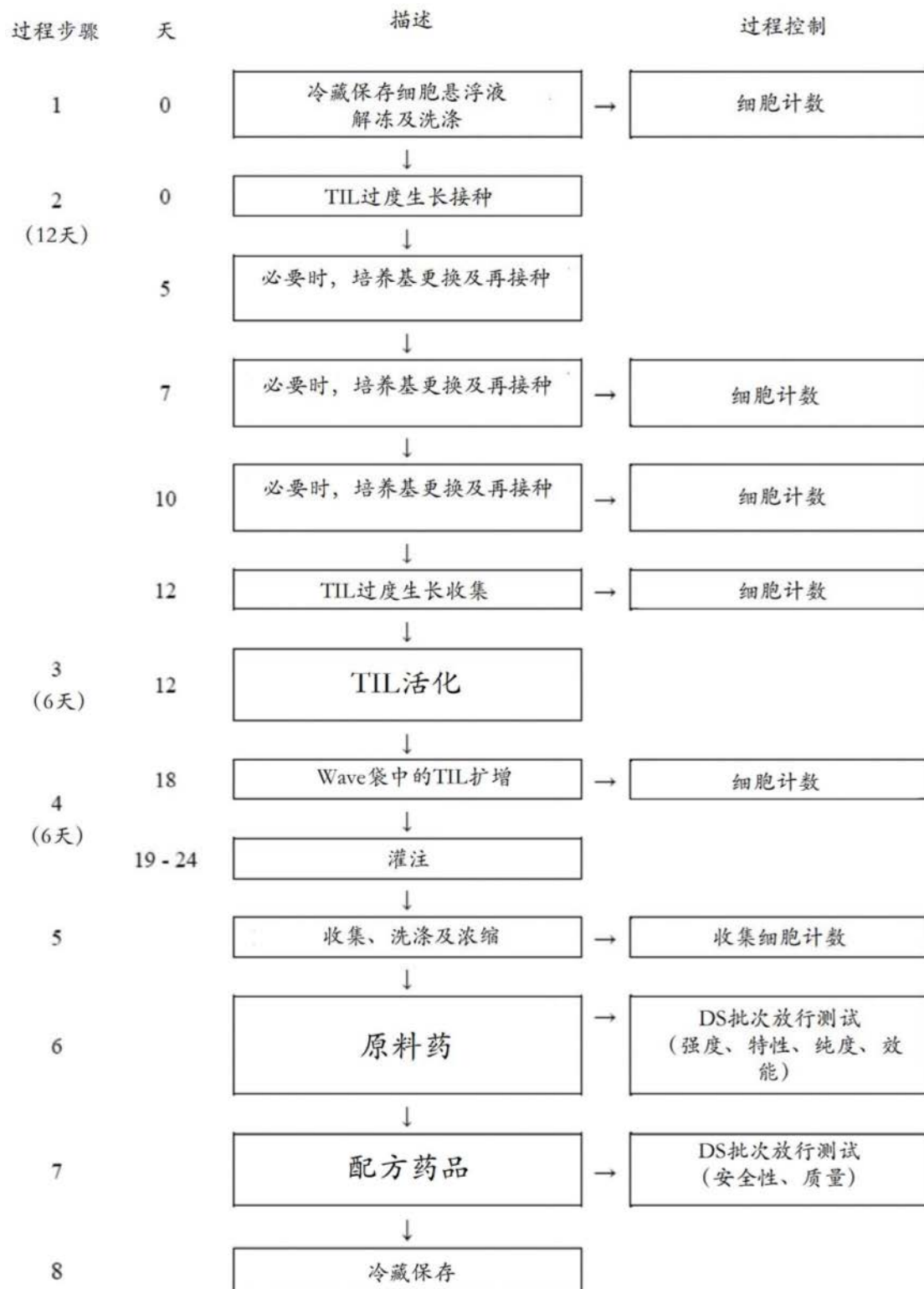


图66

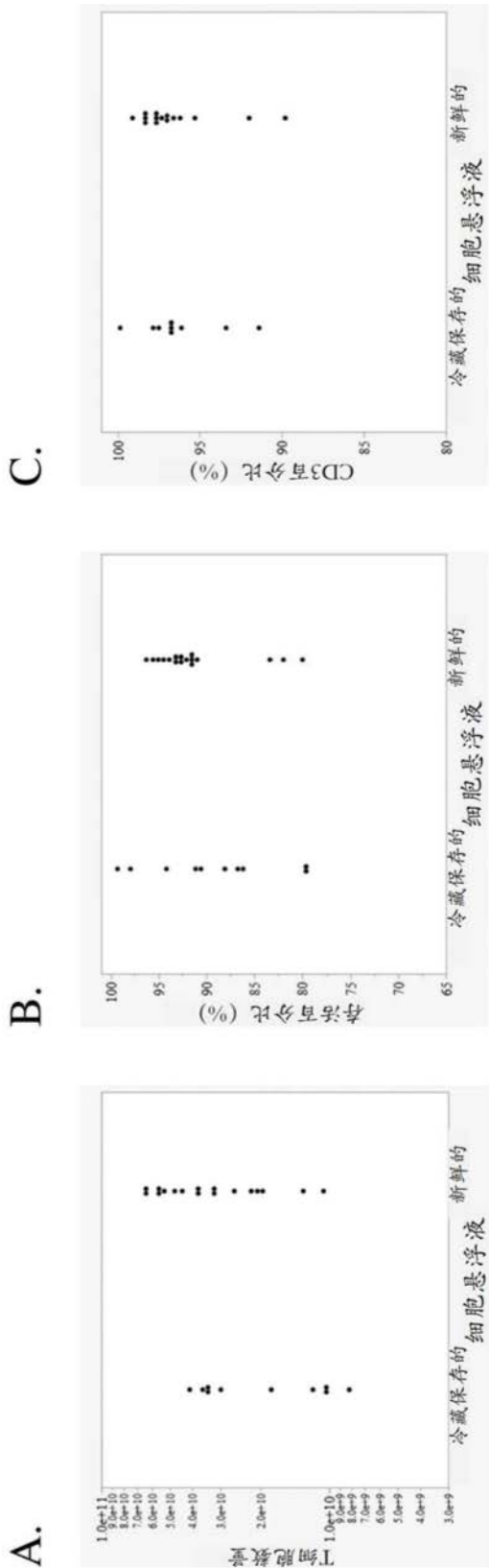


图67

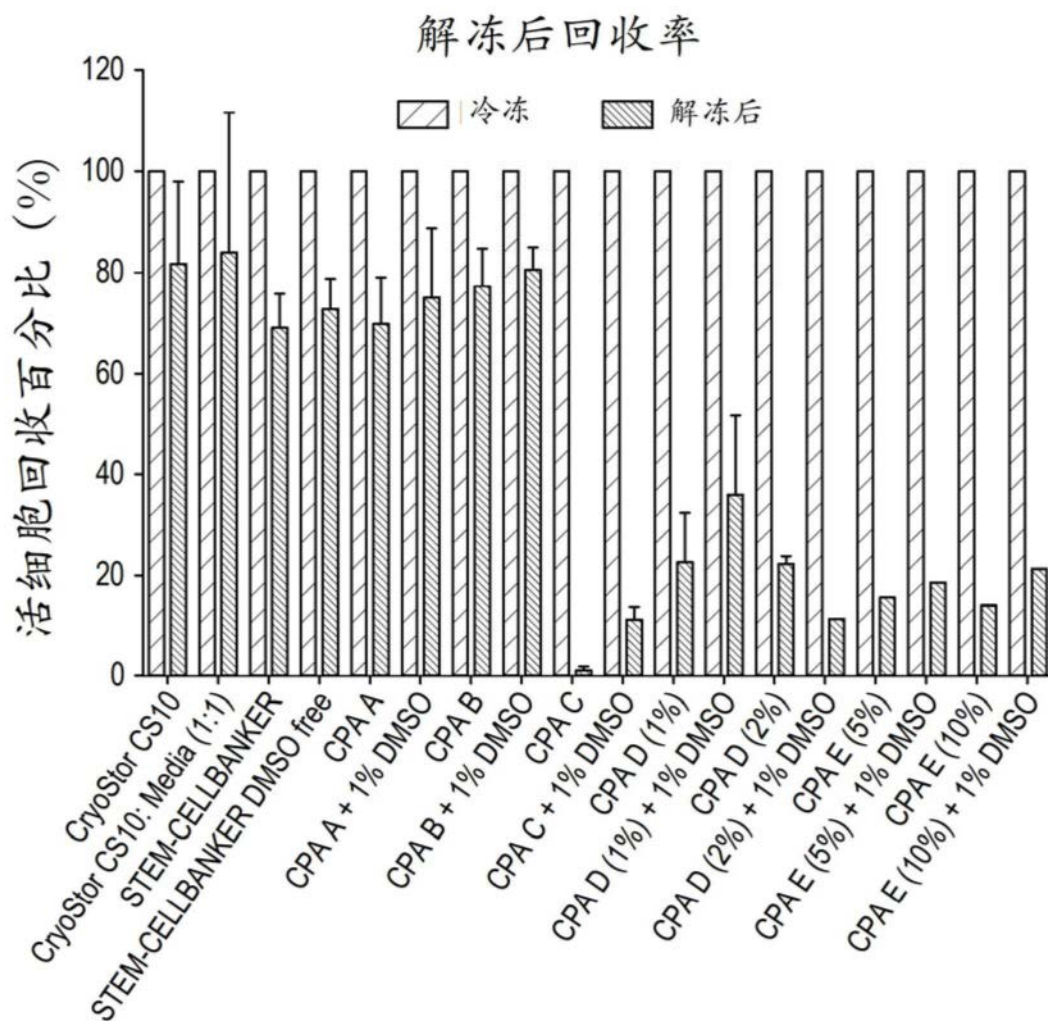


图68A

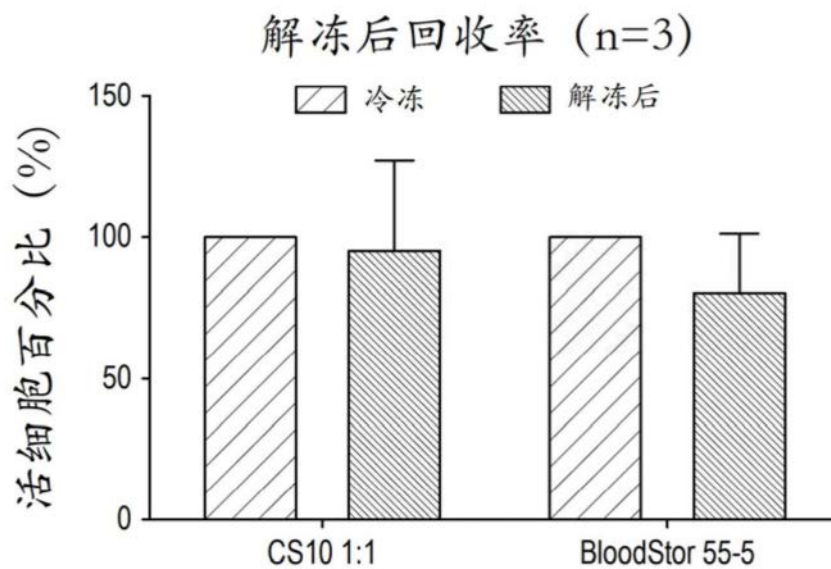


图68B

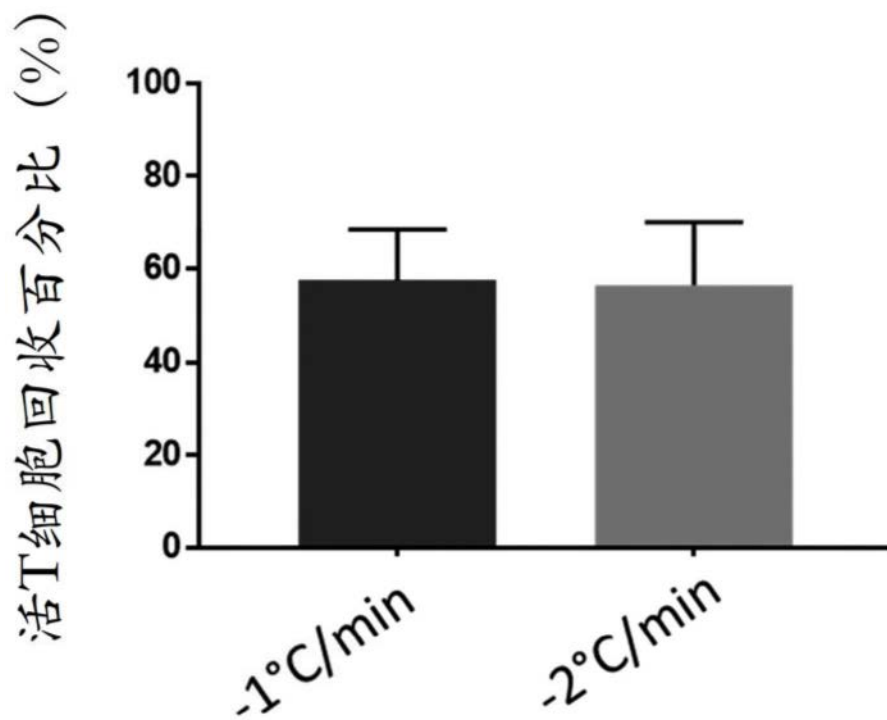


图69

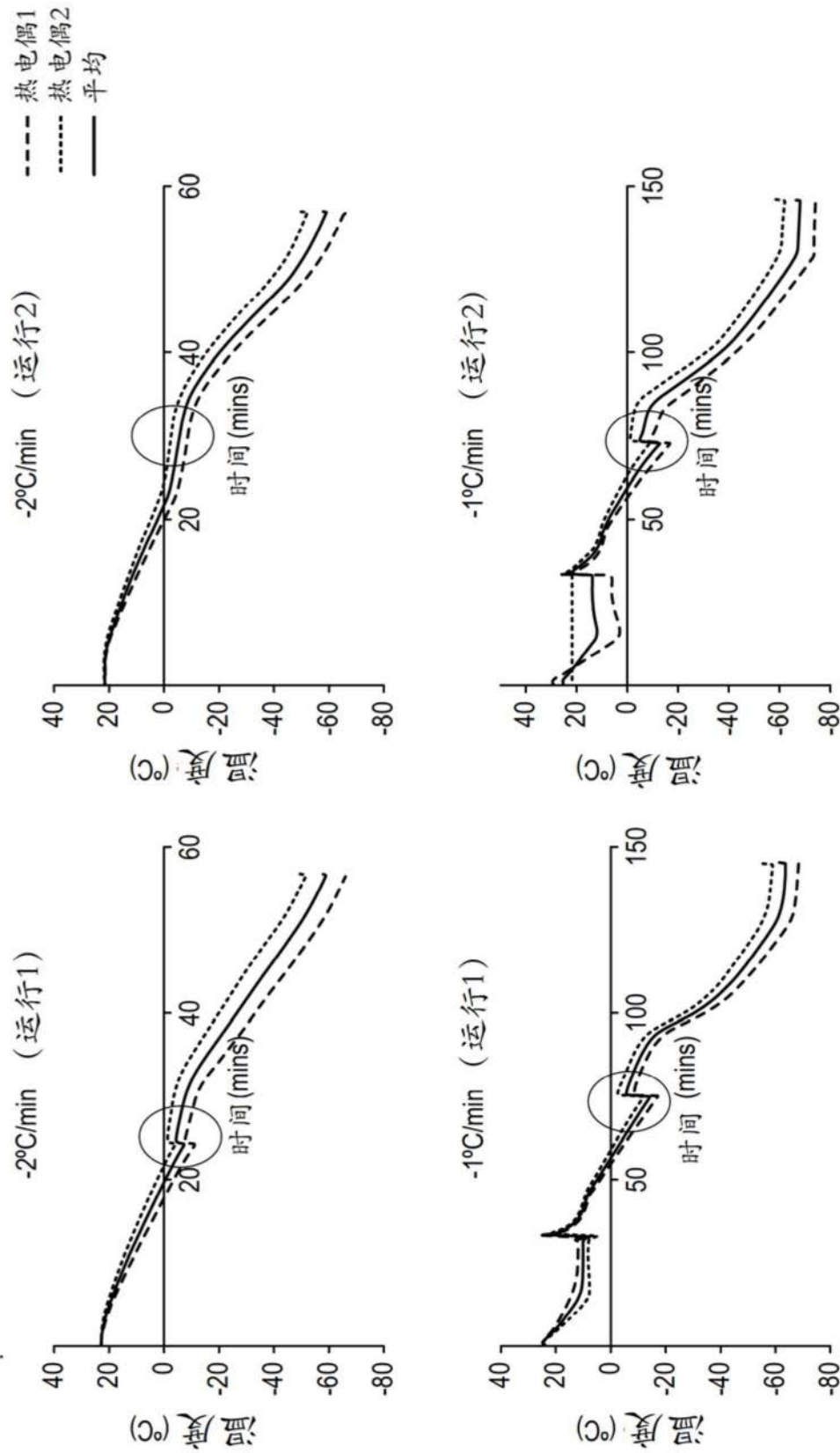


图70

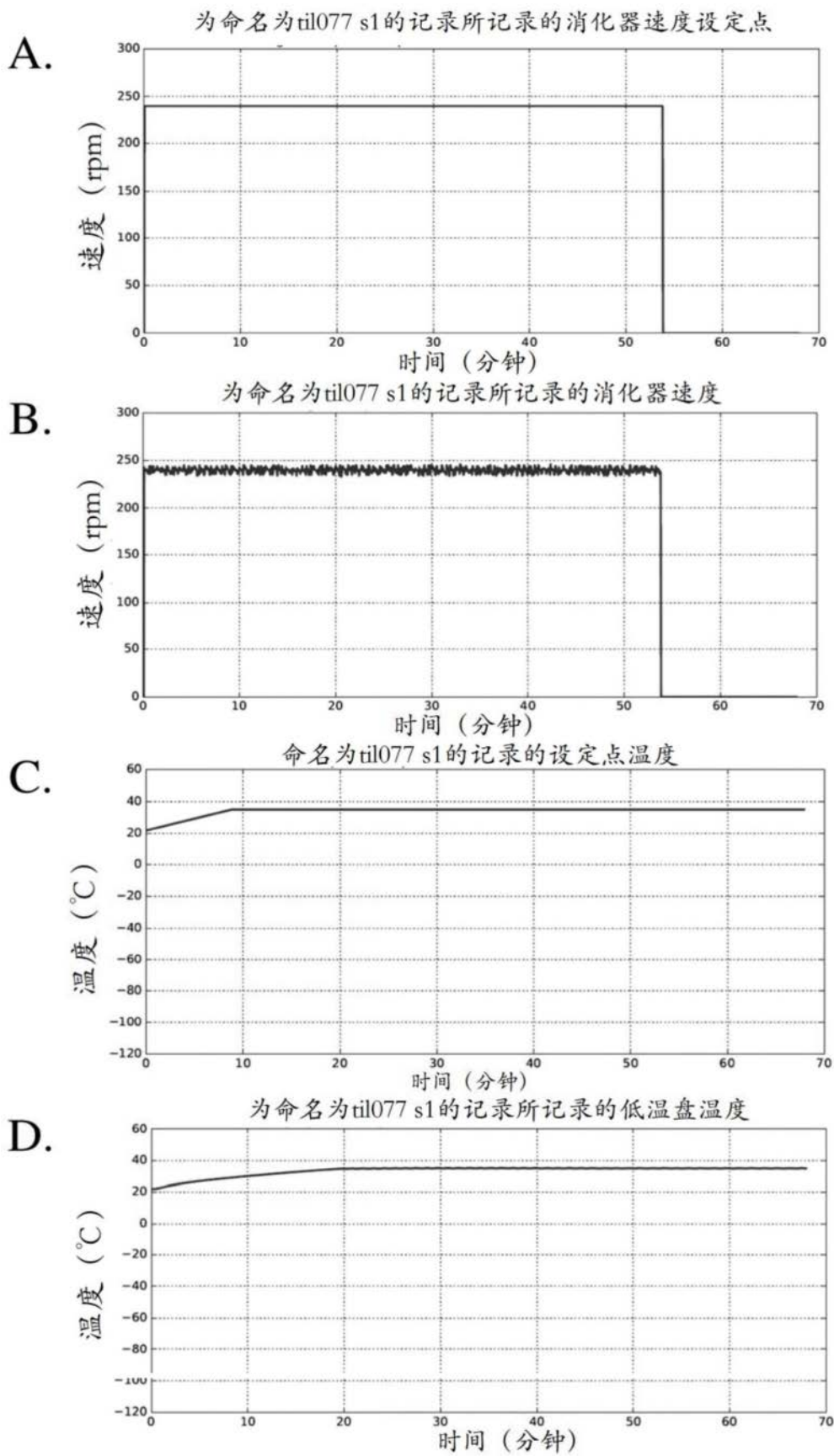


图71A-71D

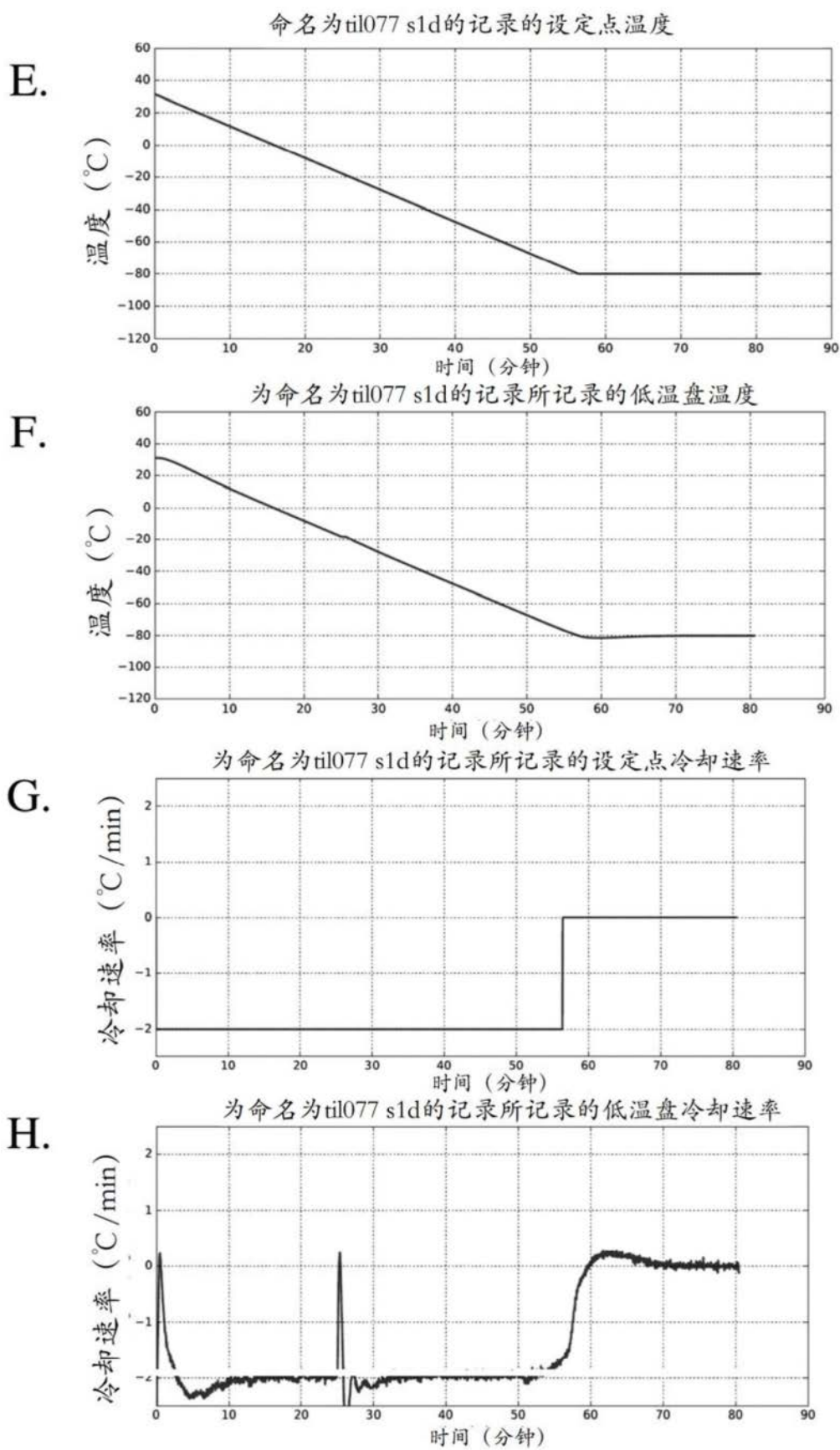


图71E-71H

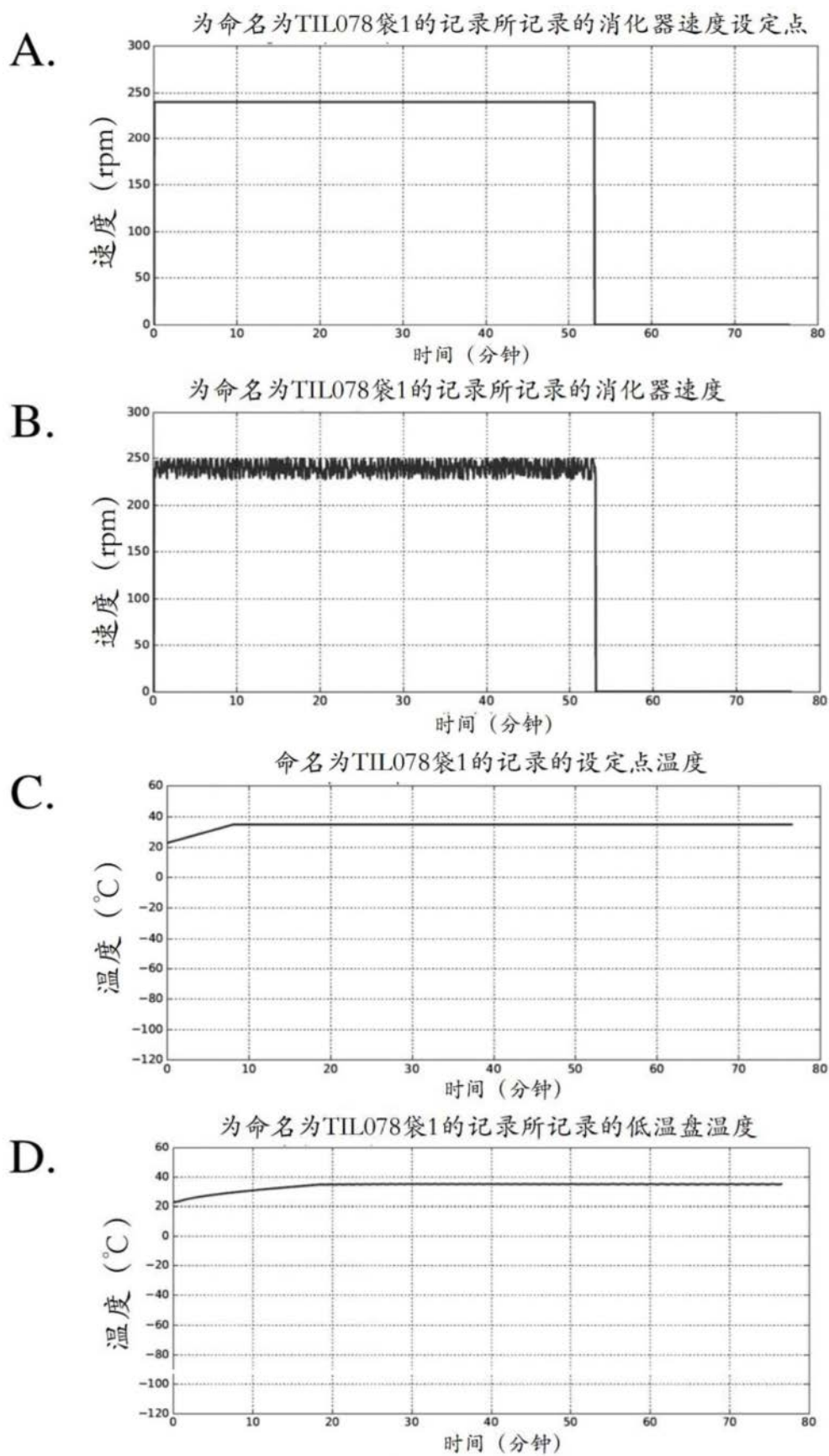


图72A-72D

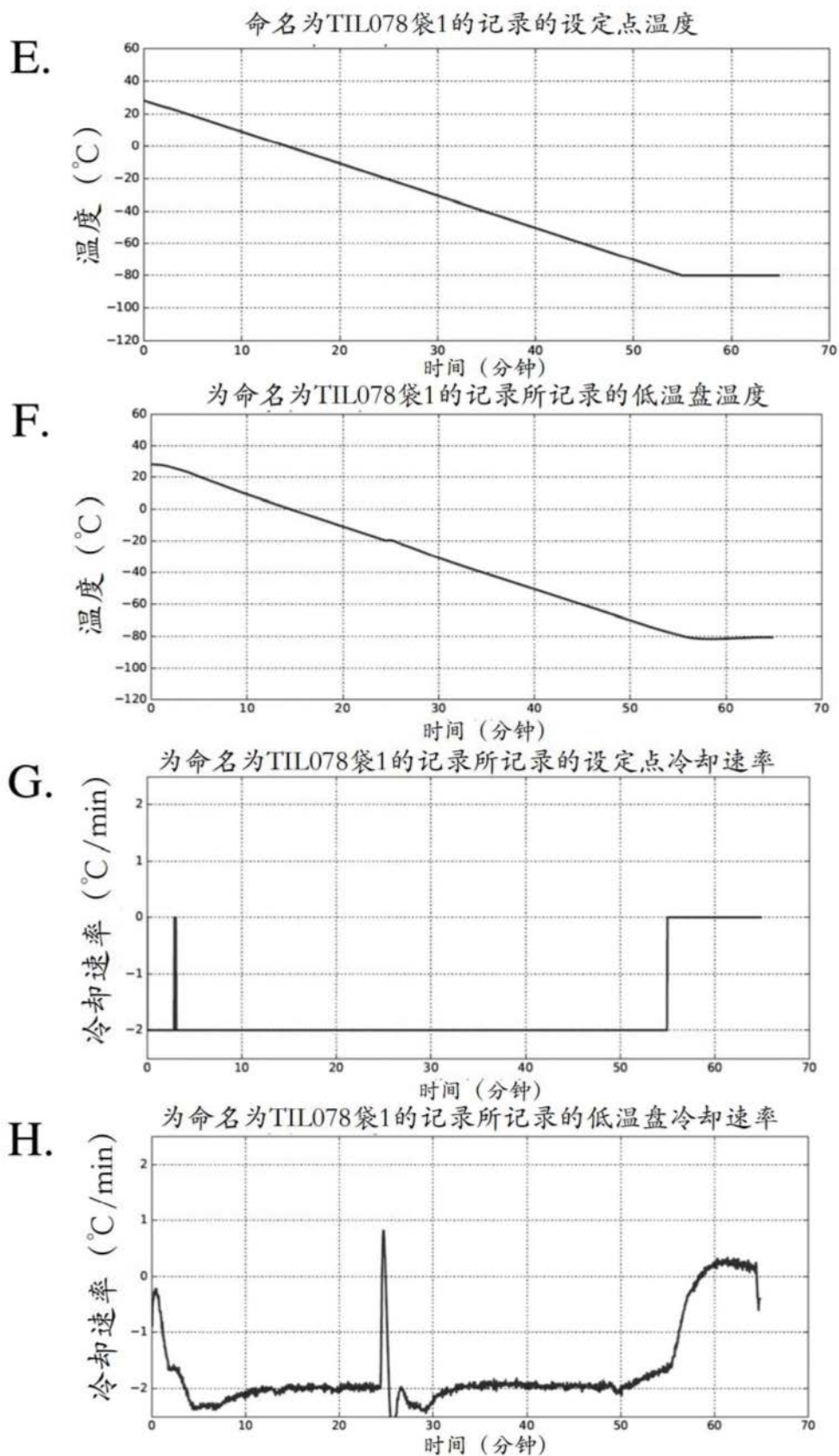


图72E-72H

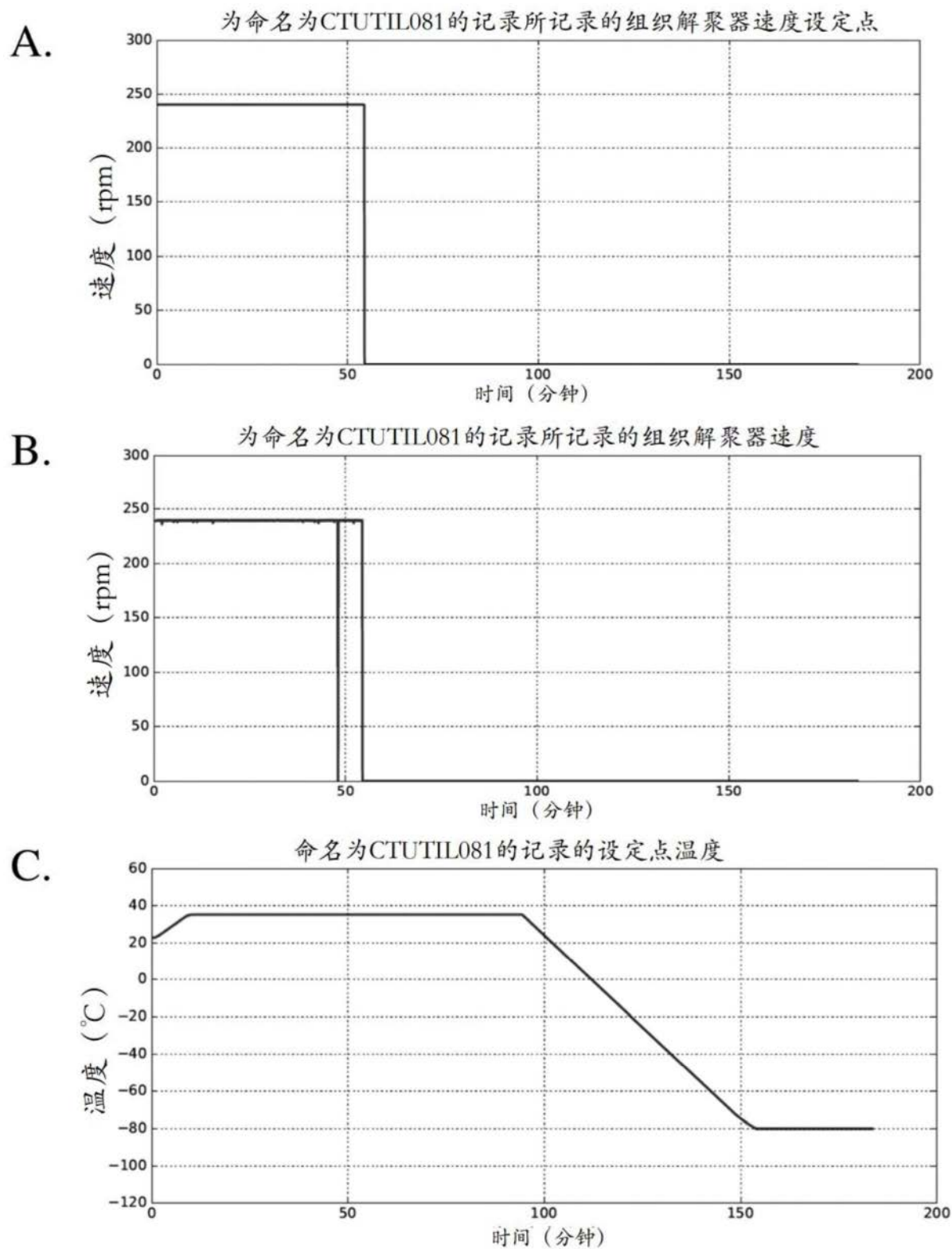
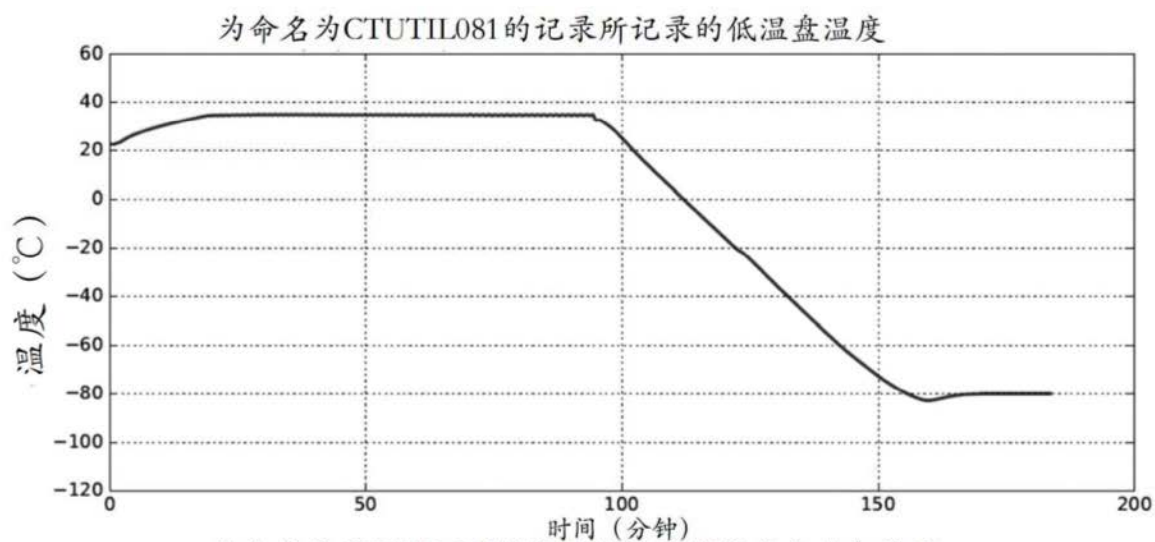
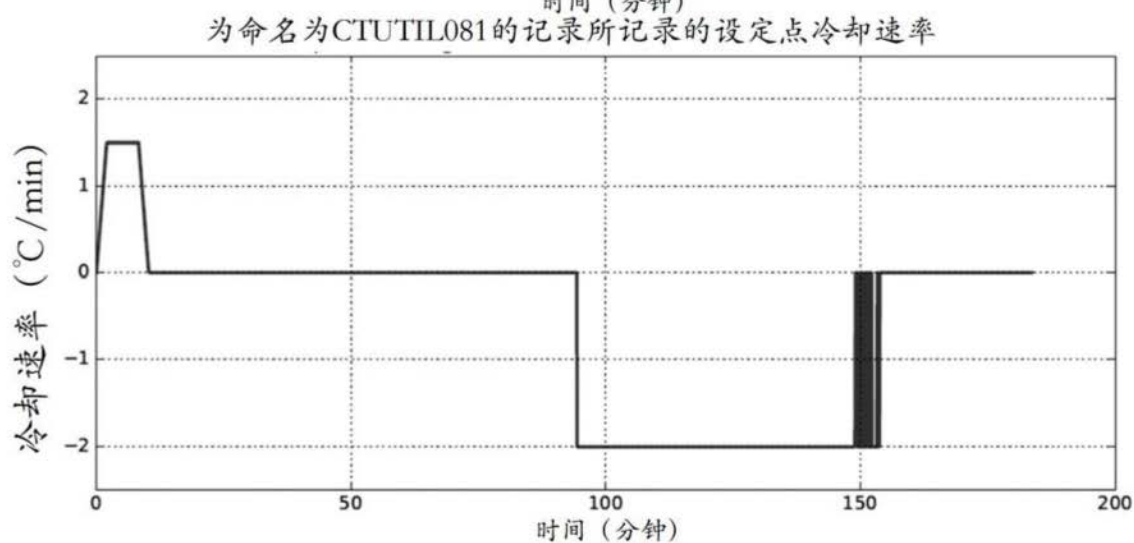


图73A-73C

D.



E.



F.

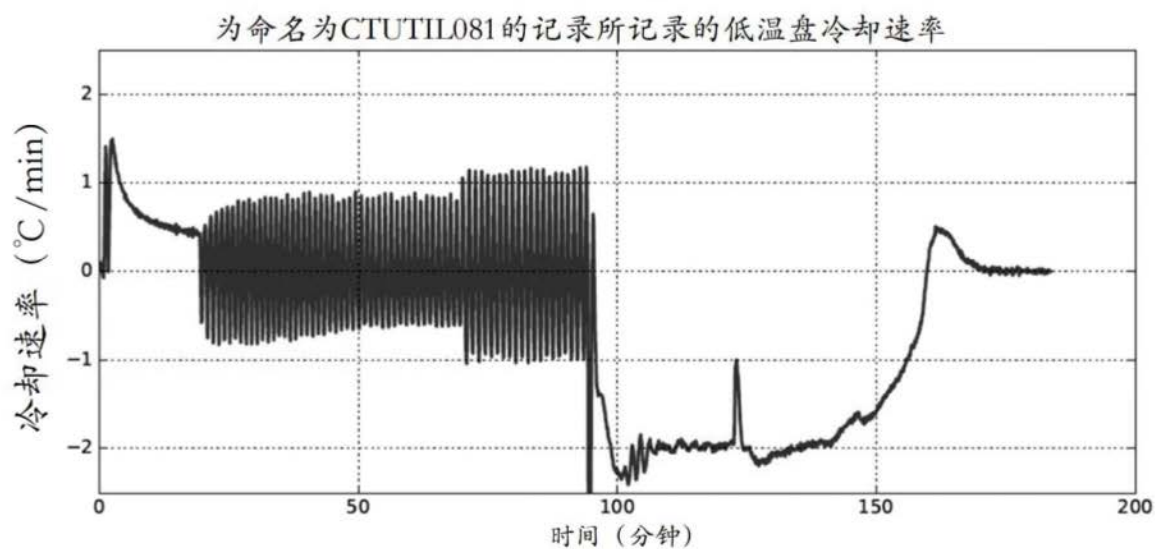


图73D-73F

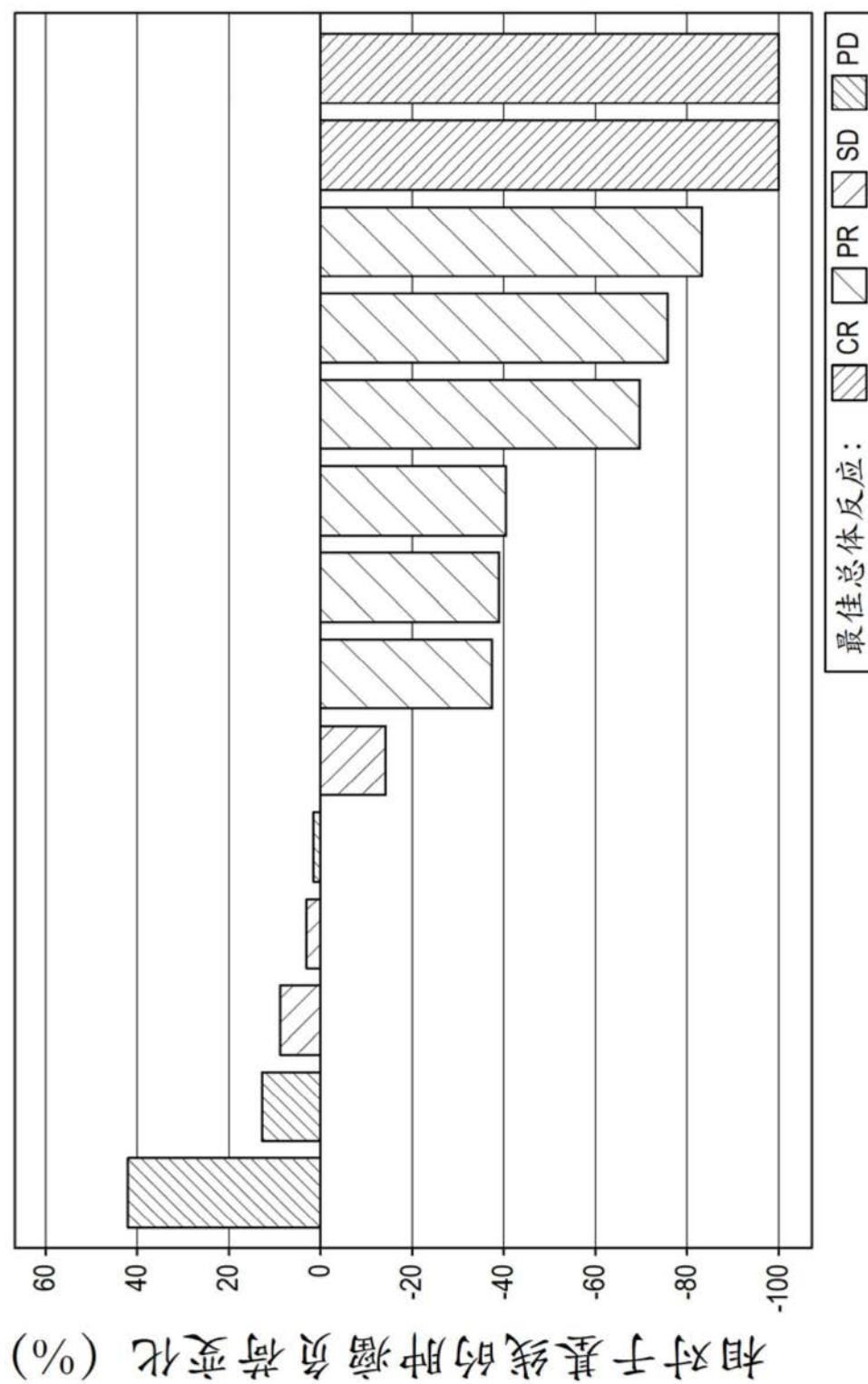


图74

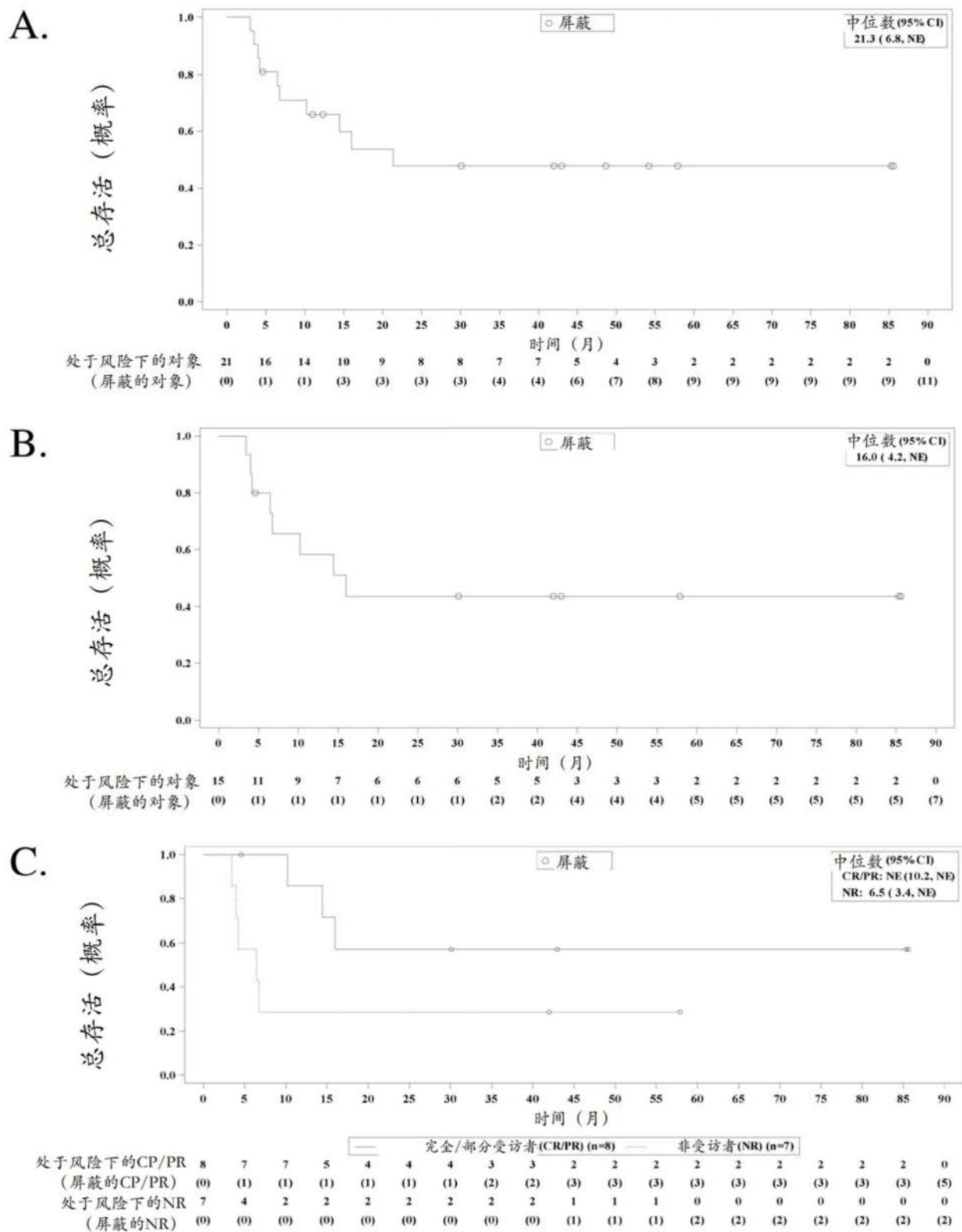


图75A-75C

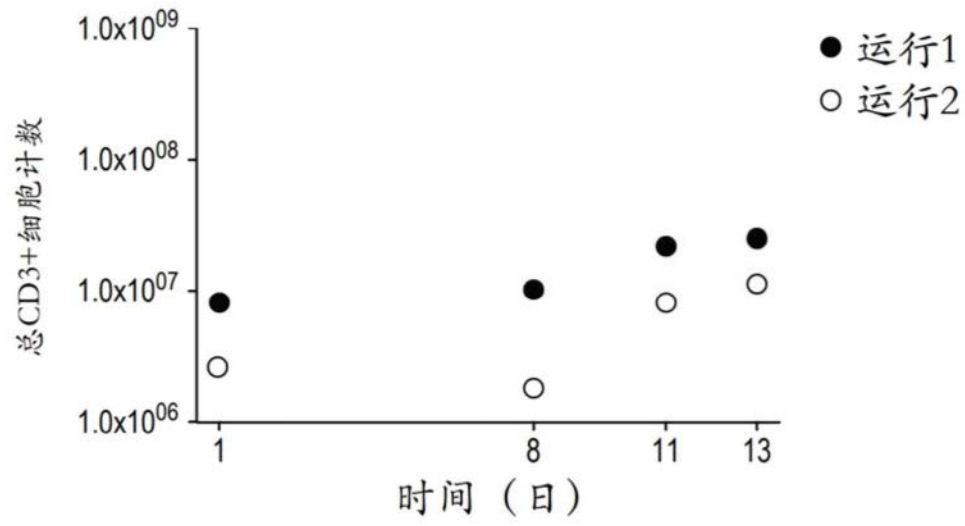


图76A

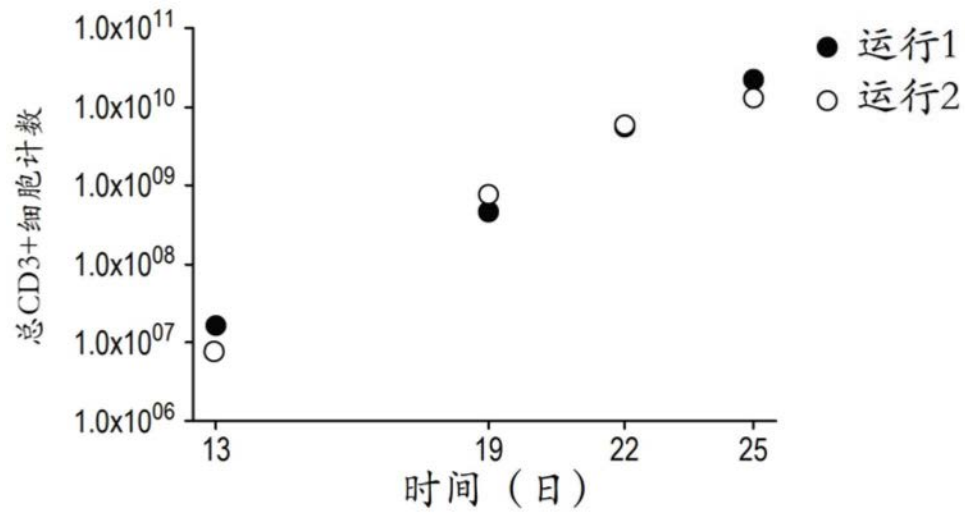


图76B

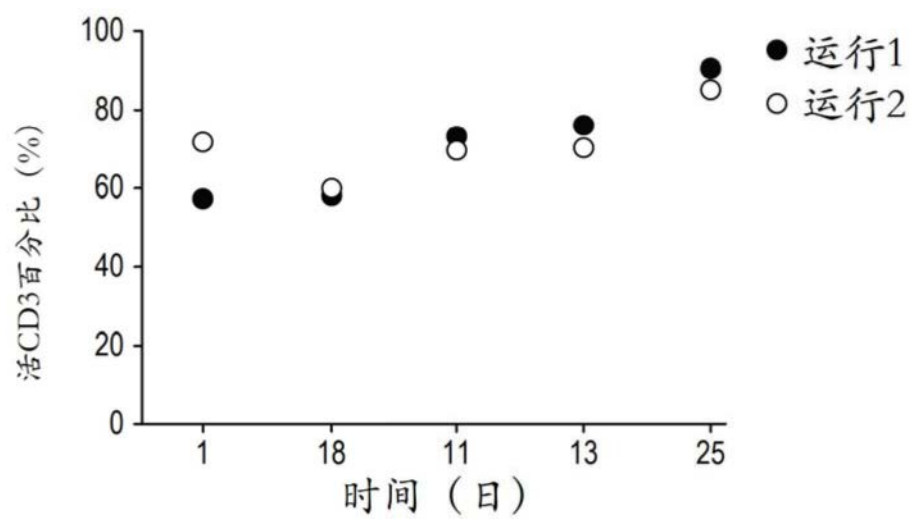


图76C