



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103732247 A

(43) 申请公布日 2014. 04. 16

(21) 申请号 201280032760. X

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2012. 05. 02

A61K 39/00(2006. 01)

(30) 优先权数据

A61K 38/17(2006. 01)

61/481, 991 2011. 05. 03 US

G01N 33/53(2006. 01)

61/528, 493 2011. 08. 29 US

A61P 35/00(2006. 01)

61/565, 225 2011. 11. 30 US

A61P 37/00(2006. 01)

61/582, 878 2012. 01. 04 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2014. 01. 02

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2012/036103 2012. 05. 02

(87) PCT国际申请的公布数据

W02012/151266 EN 2012. 11. 08

(71) 申请人 免疫创新治疗有限公司

地址 以色列耶路撒冷

(72) 发明人 迈克尔·哈-诺伊

(74) 专利代理机构 北京清亦华知识产权代理事

务所(普通合伙) 11201

代理人 李志东

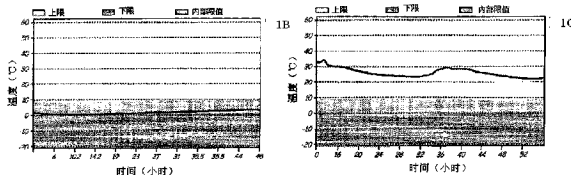
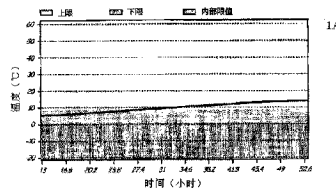
权利要求书2页 说明书15页 附图18页

(54) 发明名称

用于加工含有活细胞的生物药物的方法

(57) 摘要

本发明包括用于加工在无营养的缓冲液中的活细胞组合物的方法。在所述组合中的所述细胞被储存在无营养的培养基超过约 72 小时后维持其特性和功能性特征。所述储存方法使得所述细胞可以在加工设施处生产并被运送到医疗点现场。本发明还包括组合物,所述组合物在储存温度下被储存于无营养的缓冲液中的同时维持所述功能性特征。



1. 一种生物药物组合物,包括配制于无营养的缓冲液中的活细胞,其中所述活细胞,在所述无营养的缓冲液中被储存超过约 6 小时后,维持其在配制于所述无营养的缓冲液中前的特性和定义所述活细胞的至少一种功能性特征,所述活细胞在储存于所述无营养的缓冲液中后可用于免疫治疗。

2. 如权利要求 1 所述的组合物,其中所述活细胞被置于软质容器或注射器中,其中所述软质容器或注射器被包装于使所述活细胞维持在冷藏温度内的温度控制装置,所述优选的温度范围在约 0 摄氏度和 10 摄氏度范围内。

3. 如权利要求 1 所述的组合物,其中所述活细胞为 CD4<sup>+</sup> 细胞,并且所述活细胞被激活后为 Th1 细胞。

4. 如权利要求 3 所述的组合物,其中所述 Th1 细胞通过固定化特异性针对 T 细胞表面分子的单克隆抗体被激活,或者通过固定化抗 -CD3 和抗 -CD28 单克隆抗体被激活。

5. 如权利要求 4 所述的组合物,其中所述单克隆抗体是交联的。

6. 如权利要求 1 所述的组合物,其中所述至少一种功能性特征为 CD40、FasL、穿孔素和粒酶 B 的表达,共刺激分子的表达,粘附分子的表达,细胞因子、趋化因子的分泌,或其组合。

7. 如权利要求 6 所述的组合物,其中所述分泌的细胞因子为 IFN- $\gamma$ ,并且在储存后所述 IFN- $\gamma$  的分泌水平被恢复至与在配制时的水平相比至少约 80%。

8. 如权利要求 1 所述的组合物,其中在所述无营养的缓冲液中,所述活细胞稳定至少约 72 小时。

9. 一种用活细胞加工生物药物组合物的方法,包括:

将所述活细胞配制在无营养的缓冲液中;以及

在低于约 20 摄氏度的储存温度下,将所述活细胞维持在所述无营养的缓冲液中,其中所述活细胞维持其在配制于所述无营养的缓冲液中前的特性和定义所述活细胞的所述细胞的至少一种功能性特征,所述活细胞在被储存于所述无营养的缓冲液中超过约 6 小时后可用于免疫治疗。

10. 如权利要求 9 所述的方法,其中所述储存温度在约 0 摄氏度和约 10 摄氏度的范围内。

11. 如权利要求 9 所述的方法,其中在所述无营养的缓冲液中的所述细胞的所述浓度为约  $10^6$  个细胞 / 毫升以上和 / 或所述活细胞被置于软质容器或注射器中,其中所述软质容器或注射器被包装于使所述活细胞维持在冷藏温度内的温度控制装置中。

12. 如权利要求 9 所述的方法,其中所述活细胞为 CD4<sup>+</sup> 细胞,并且所述活细胞被激活后为 Th1 细胞。

13. 如权利要求 12 所述的方法,其中所述 Th1 细胞通过固定化交联的单克隆抗体被激活,或者所述 Th1 细胞通过固定化抗 -CD3 和抗 -CD28 单克隆抗体被激活。

14. 如权利要求 9 所述的方法,其中所述功能性特征为 CD40、FasL、穿孔素和粒酶 B 的表达,共刺激分子的表达,粘附分子的表达,细胞因子、趋化因子的分泌,或其组合。

15. 如权利要求 9 所述的方法,其中在所述组合物中的所述活细胞储存后表达 CD40L,所述表达 CD40L 的表达量相对于配制时 CD40L 的表达量为至少约 80%。

16. 如权利要求 14 所述的方法,其中所述分泌的炎性细胞因子为 IFN- $\gamma$ ,并且所述分

泌的水平为与所述配制时水平相比至少约 80% 的量。

17. 如权利要求 16 所述的方法,其中储存后所述 IFN- $\gamma$  的分泌在 37 摄氏度孵育至少 24 小时后被恢复。

18. 如权利要求 9 所述的方法,其中在所述无营养的缓冲液中,所述活细胞稳定至少约 72 小时。

19. 一种提供活细胞组合物至医疗设施点的方法,包括:

在加工设施处将所述活细胞配制在无营养的缓冲液中;和

将所述细胞在包装中运输至所述医疗设施点,所述包装被装备成维持低于约 20 摄氏度的储存温度,其中所述活细胞处于所述储存温度下超过约 6 小时,并维持其可用于免疫治疗的活细胞的特性和至少一种功能性特征。

20. 如权利要求 19 所述的方法,进一步包括在运输前将所述配制的细胞置于软质容器或注射器中。

21. 如权利要求 19 所述的方法,其中所述活细胞为 CD4<sup>+</sup> 细胞,并且所述活细胞被激活后为 Th1 细胞。

22. 如权利要求 21 所述的方法,其中所述 Th1 细胞通过固定化单克隆抗体而被激活,其中所述单克隆抗体是交联的。

23. 如权利要求 19 所述的方法,其中在运输和从所述储存温度移出后,在所述组合物中的所述活细胞表达 CD40L,所述表达 CD40L 的表达量相对于配制时 CD40L 的表达量为至少约 80%。

24. 如权利要求 19 所述的方法,其中在运输和从所述储存温度移出后,在所述组合物中的所述细胞储存分泌 IFN- $\gamma$  的量与所述配制时的水平相比为至少约 80%。

25. 如权利要求 24 所述的方法,其中运输和储存后所述 IFN- $\gamma$  的分泌在 37 摄氏度孵育至少 24 小时后被恢复。

26. 如权利要求 19 所述的方法,其中在所述无营养的缓冲液中的所述活细胞处于储存温度至少约 72 小时。

27. 一种对患者给药免疫治疗的方法,包括给药包含配制在无营养的缓冲液中的活细胞的组合物,其中所述组合物已经被储存于所述无营养的缓冲液中超过约 6 小时,其中所述活细胞维持其在配制于所述无营养的缓冲液中前的特性和定义所述活细胞的所述细胞的至少一种功能性特征,所述活细胞可用于免疫治疗中。

28. 如权利要求 27 所述的方法,其中所述活细胞是被激活的 Th1 细胞。

29. 如权利要求 28 所述的方法,其中所述功能性特征为 CD40、FasL、穿孔素和粒酶 B 的表达,共刺激分子的表达,粘附分子的表达,细胞因子、趋化因子的分泌,或其组合。

30. 如权利要求 28 所述的方法,其中在所述组合物中的所述活细胞储存后表达 CD40L,所述表达 CD40L 的表达量相对于配制时 CD40L 的表达量为至少约 80%。

31. 如权利要求 28 所述的方法,其中在所述组合物中的所述细胞储存后分泌 IFN- $\gamma$ ,所述分泌 IFN- $\gamma$  的量与所述配制时水平相比为至少约 80%,以及其中储存后所述 IFN- $\gamma$  的分泌在 37 摄氏度孵育至少 24 小时后被恢复。

32. 如权利要求 28 所述的方法,其中在所述无营养的缓冲液中的所述活细胞储存至少约 72 小时。

## 用于加工含有活细胞的生物药物的方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及用于加工生物药物的方法,该含有活细胞悬浮液的生物药物被配制在无营养的缓冲液中。更具体地,本发明涉及在无营养的培养基中活的免疫细胞悬浮液的包装、运送和配送,从而所述细胞维持其独特特性、功能和活性的属性。

### 背景技术

[0002] 细胞治疗对于肿瘤、病毒和细菌性病原体是一个潜在的根治性治疗。细胞治疗也可以被用于治疗自身免疫型疾病(如类风湿性关节炎、多发性硬化症和 I 型糖尿病),神经系统疾病(例如老年痴呆症(Alzheimer's)、肌萎缩侧索硬化症(ALS)和帕金森氏病),以及抗衰老治疗,心血管障碍的创伤修复和治疗。利用免疫系统的力量治疗或预防疾病是免疫疗法的一个主要的目的。为了增强或抑制在患者中的免疫应答,多种免疫治疗方法和组合物被开发出来。细胞治疗方法一般包含如细胞增殖、分化和/或激活的体外操作。对其操作多于最低限度的细胞被美国食品和药品监督管理局(USFDA)或在其他司法管辖区的监管机构认为是生物药物。在这种可以用于治疗或预防各种疾病的生物药物在市场上被销售前,这些产品必须在试验性新药申请(IND)下首先在人体临床试验中被研究,或等同的研究。

[0003] 对于商业用途,用于生产含有活细胞的生物药物的方法必须是标准化的,从而所获得的细胞具有预定特性、功能和活性释放标准。设计作为生物药物使用的细胞的增殖、分化和/或激活的方法通常在所述细胞被保持在营养丰富培养基中的体外发生。然而,在对人体给药所述细胞前,所述细胞必须被转移至无营养的输注缓冲液中。由于这些缓冲溶液不含有营养成分,所述细胞只在短时期内保持活性。此外,即使所述细胞在被置于无营养的输注缓冲液中后保持活性,它们快速丧失其独特特性和功能性特征。丧失其独特特性和功能性特征使得所述细胞不能作为生物药物使用。这个限制需要所述作为生物药物使用的细胞必须被配制在所述医疗点或接近所述医疗点。由于在制剂中所述活细胞产品有限的保存期限,细胞被配制在所述医疗点或接近所述医疗点的需求严重地限制了这类产品的所述商业活性。

[0004] 活细胞在营养丰富的培养基中是比较稳定的。营养丰富的培养基的示例包括:例如,X-Vivo15(Bio Whittaker, Walkersville, DM)、PRMI 1640、DMEM、Ham's F12、McCoy's 7A 和 Medium199。所述培养基可以补充以添加剂,所述添加剂包括血清、血清蛋白、生长抑制和生长促进物质,例如促有丝分裂单克隆抗体和用于选择基因设计或修饰细胞的选择性试剂。然而,例如对患者给药所需要的将所述细胞向无营养的缓冲液的转移可导致所述细胞的特性、细胞活性和所述细胞的所述功能性特征的快速降解。无营养的缓冲液的示例包括:例如,如生理盐水、磷酸盐缓冲液、5%右旋糖、Plasma-Lyte(Baxter Scientific, Deerfield, IL)和 Normasol(Abbott Laboratories, Abbott Park, IL)的等渗溶液。此外,当细胞被转移至无营养的缓冲液中时,通常认为提供激活和/或分化信号以及如刺激分子或细胞因子的其他成分的试剂应该被在所述转移至无营养的缓冲液中前去除(参见

Berenson 等的美国专利 6,867,041)。因此,在无营养的缓冲液中的细胞通常具有有限的保存期限并且可以,例如,在数分钟内开始丧失其标识属性和活力,以及很难维持其功能性和特性特征超过几个小时。

[0005] 目前,包括活细胞的免疫治疗的组合物通常是在临近患者的治疗点的 cGMP 设施中被生产的(参见 Gruenberg 的美国专利公开号 2003/0175242)。包含活细胞的生物药物的配制必须在高度控制和无菌条件的 cGMP 设施中完成。所述活细胞在 cGMP 设施处被操作并且被配制用于输注到患者体内。一旦所述细胞被制备用于输注,所述细胞被快速转移至所述医疗点现场并对所述患者给药。该方法的主要缺陷在于 cGMP 设施需要出现在每个医疗点现场附近。所述 cGMP 设施需要给职员大量的货币资本,并且所述 cGMP 设施在所述需要的规章制度下运行。在每个医疗点现场或附近建立大量这些中心的需求是成本高昂的,并且对于这类药物的所述商业潜力是严重的限制。这导致了一个艰难的抉择:通过建设大量 cGMP 设施以增加对患者可利用率所承担巨大的费用,或通过只建立有限数量的 cGMP 设施以最小化资本支出而给患者提供有限可利用率。因此,在活细胞治疗领域,使细胞在无营养的缓冲液中具有更长保存期限的方法是必要的。此外,可以使得悬浮于无营养成分的输注缓冲液中经过配制的细胞产品包装、运送和大规模配送的方法是必要的。

[0006] 维持所述配制后用于适应性免疫治疗的细胞的特性和功能的问题被描述于,例如, Gruenberg 的美国专利公开号 2003/0175272。该公开教导 T 细胞必须在对患者给药前(输注前不超过 4 小时)被再激活,以便维持细胞因子产生的功能性特征。所述细胞的功能可以被维持多达 48 小时,只要所述制剂包括自体同源的血浆。然而,从每个目的患者收集的血浆不利于大规模配送和商业化。

## 发明内容

[0007] 在第一方面,本发明包括一种生物药物组合物。所述药物组合物包括配制于无营养的缓冲液中的活细胞。所述活细胞,在所述无营养的缓冲液中被储存超过约 6 小时后,维持其在配制于所述无营养的缓冲液中前的特性和定义所述活细胞的至少一种功能性特征。这些活细胞在储存于所述无营养的缓冲液中后可用于免疫治疗。它们维持其在配制于所述无营养的缓冲液中至少 72 小时前的特性和定义所述活细胞的至少一种功能性特征。

[0008] 在另一个方面,本发明包括一种用活细胞加工生物药物组合物的方法。所述方法包括将所述活细胞配制在无营养的缓冲液中;以及在低于约 20 摄氏度的储存温度下,将所述活细胞维持在所述无营养的缓冲液中。所述活细胞维持其在配制于所述无营养的缓冲液中前的特性和定义所述活细胞的至少一种功能性特征。所述活细胞被储存于所述无营养的缓冲液中超过约 72 小时后可用于免疫治疗。优选地,所述储存温度在约 4 摄氏度和约 8 摄氏度之间的范围内,并且在所述无营养的缓冲液中的所述细胞的浓度为约  $10^7$  个细胞/毫升以上。在 T 细胞的组合物中,所述活细胞被优选地配制为被激活的状态。为了激活所述 T 细胞,优选使用对细胞表面分子有反应的固定化的单克隆抗体。优选地,所述细胞表面分子为第一下列中的一个:CD3、MHCI、MHCII、CD2,和第二共刺激分子的组合。优选地,所述共刺激分子为 CD28。所述活细胞被置于软质容器或注射器中,其中所述软质容器或注射器被包装于使所述活细胞维持在储存温度的温度控制装置中。所述方法还包括将在温度控制装置中的所述包装运送和配送至所述医疗点。

[0009] 在另一个方面,本发明包括一种提供活细胞组合物至医疗设施点的方法。所述方法包括在加工设施处将所述活细胞配制在无营养的缓冲液中;和将所述细胞在包装中运输至所述医疗设施点,所述包装被装备成维持低于约 20 摄氏度的储存温度。所述活细胞处于所述储存温度多达约 72 小时,并维持其可用于免疫治疗的活细胞的特性和至少一种功能性特征。

[0010] 在另一个方面,本发明包括一种对患者给药免疫治疗的方法。所述方法包括给药包含配制于无营养的缓冲液中的活细胞的组合物,其中所述组合物已经被储存于所述无营养的缓冲液中多达约 72 小时,其中所述活细胞维持其在配制于所述无营养的缓冲液中前的特性和定义所述活细胞的所述细胞的至少一种功能性特征,所述活细胞可用于免疫治疗。

[0011] 在另一个方面,本发明包括另一种对患者给药免疫治疗的方法。所述方法包括给药包含配制在无营养的缓冲液中的活细胞的组合物,其中所述组合物被预先以冷冻的状态被储存,例如在液氮中储存多达 2 年以上并已经被复苏和配制并储存在所述无营养的缓冲液中多达约 72 小时,其中所述活细胞维持其在配制于所述无营养的缓冲液中前的特性和定义所述活细胞的至少一种功能性特征,所述活细胞可用于免疫治疗。

#### 附图说明

[0012] 图 1A 是运输过程中容器内的温度变化图,其中所述容器没有经过预处理。

[0013] 图 1B 是在经过预处理的气凝胶保温箱内部记录的温度的绘图。

[0014] 图 1C 是运输过程中空气温度的绘图。

[0015] 图 2A-2C 显示了细胞包装和运送之前和之后,HTC273、HTC245 和 HTC264 各自的 CD40L 表达。

[0016] 图 3A-3C 显示了细胞包装和运送之前和之后,HTC273、HTC245 和 HTC264 各自的细胞活性。

[0017] 图 4A-4C 显示了细胞包装和运送之前和之后,HTC273、HTC245 和 HTC264 各自的 IFN- $\gamma$  分泌。

[0018] 图 5A-5C 显示了细胞包装和运送后接着在 37 摄氏度下孵育 6 小时的之前和之后,HTC273、HTC245 和 HTC264 各自的 IFN- $\gamma$  分泌。

[0019] 图 6A-6C 显示了细胞被配制为用于 ID、IT 和 IV 给药,HTC273、HTC264 和 HTC245 各自的 CD40L 表达。

[0020] 图 7A-7C 显示了细胞被配制为用于 ID、IT 和 IV 给药,HTC273、HTC264 和 HTC245 各自的细胞活性。

[0021] 图 8A-8C 显示了细胞被配制为用于 ID、IT 和 IV 给药,HTC273、HTC264 和 HTC245 各自的 IFN- $\gamma$  分泌。

[0022] 图 9A-9C 显示了细胞被配制为用于 ID、IT 和 IV 给药并储存 24 和 48 小时,HTC273、HTC264 和 HTC245 各自的 CD40L 表达。

[0023] 图 10A-10C 显示了细胞被配制为用于 ID、IT 和 IV 给药并储存 24 和 48 小时,HTC273、HTC264 和 HTC245 各自的 IFN- $\gamma$  分泌。

[0024] 图 11A-11C 显示了细胞被配制为用于 ID、IT 和 IV 给药并储存 24 和 48 小时,

HTC273、HTC264 和 HTC245 各自的细胞活性。

[0025] 图 12A-12C 显示了 HTC264 细胞储存 24、48 和 72 小时后 CD40L 的表达、细胞的活性以及 IFN- $\gamma$  的分泌。

[0026] 图 12D 显示了 HTC264 细胞储存 72 小时并在 37 摄氏度孵育 24 小时后 IFN- $\gamma$  的分泌。

[0027] 图 13A-13C 显示了 HTC245 细胞储存 24、48 和 72 小时后 CD40L 的表达、细胞的活性以及 IFN- $\gamma$  的分泌。

[0028] 图 13D 显示了 HTC245 细胞储存 72 小时并在 37 摄氏度孵育 24 小时后 IFN- $\gamma$  的分泌。

[0029] 图 14A-14C 显示了 HTC273 细胞储存 24、48 和 72 小时后 CD40L 的表达、细胞的活性以及 IFN- $\gamma$  的分泌。

[0030] 图 14D 显示了针对 3 批不同的 HTC273 细胞储存 72 小时并在 37 摄氏度孵育 24 小时后 IFN- $\gamma$  的分泌。

[0031] 图 15A-15C 显示了 HTC245、HTC264 和 HTC273 细胞 CAC 和 CFB48 小时后各自的 CD40L 表达。

[0032] 图 16A-16C 显示了 HTC245、HTC264 和 HTC273 细胞 CAC 和 CFB48 小时后各自的细胞活性。

[0033] 图 17A-17C 显示了 HTC245、HTC264 和 HTC273 细胞 CAC 和 CFB48 小时后各自的 IFN- $\gamma$  分泌。

### 具体实施方式

[0034] 本发明涉及配制在无营养的缓冲液中的活细胞生物药物产品的包装、储存和配送,所述活细胞生物药物即使在较长的时间后也可以表现出可用于免疫治疗的细胞特征。该活细胞生物药物即使在所述无营养的缓冲液中约 72 小时后也可以维持活性以及预定的特性和功能性特征。

[0035] 在一些示例性的实施例中,作为生物药物产品使用的免疫 Th1 记忆细胞可以维持活性、保持预定的特性(如 CD4<sup>+</sup>、CD45RO<sup>+</sup>、CD40L<sup>hi</sup>、CD62L<sup>lo</sup>)和恢复功能性特征(例如 IFN-伽马的分泌大于 1,000pg/10<sup>6</sup> 个细胞/4 小时)。这些免疫 Th1 记忆细胞当与 CD3/CD28- 包被的微珠配制在无营养的缓冲液中并保持在冷冻状态时,可以表现出这些细胞特征长达至少约 72 小时。

[0036] 所述包含活细胞的生物产品可以在环境受控的条件下进行包装以便维持所期望的储存条件,并且通过快件速递服务(例如,联邦快递、联合包裹服务(UPS)、和类似的国际快递)几乎从世界各地被运送到医疗点。优选地,具有所述活细胞的所述包装在冷冻的条件下进行储存并运输。在所述医疗点,所述经过配制的细胞可以从所述包装中取出并对患者给药。所述经过配制的细胞在从所述冷冻的包装中取出后维持稳定长达约 6 小时。优选地,所述细胞首先在所述医疗点从冷冻包装中取出,并在对患者给药前被允许平衡至室温 1 至 2 小时。所运输的细胞惊人地稳定,并且所运输的细胞能够用于与未经较长时间储存的细胞类似的方法。

[0037] 可选地,所述细胞在冷冻状态被储存并运输至医疗点。在医疗点所述细胞可以以

冷冻状态被储存,并且所述细胞可以被配制于自动化或半自动化的密封的、无菌系统中而后再对患者给药前以冷藏的状态被现场储存长达约 72 小时。

[0038] 活细胞可以是任何细胞,其不仅是经过最少操作的细胞,因为 FDA 使用该术语是用于确定细胞产品是生物药物,其只需要根据新药临床研究 (IND) 申请或相当在人中进行评估,并且根据 C. F. R21 中适用的 211、606 和 820 部分根据在药品生产质量规范 (GMP) 进行制造。

[0039] 所述活细胞可以是单一类型的或者是混合型,只要它们具有经过定义的特性和功能性标准。所述细胞可以是天然的或者是经过设计的,可以是来自于自体同源的、同种异体的和 / 或异种的供体。当所述活细胞为所述生物药物的活性成分时,其他物质可以被加入到所述细胞,例如生物活性蛋白、肽、化学制品、核苷酸 (RNA、DNA) 和 / 或装置。所述细胞可以游离地悬浮于制剂中、附着在表面或装置上、或封装于装置或材料中。所述细胞旨在于治疗或预防疾病或状况的发生。所述细胞可以在机体的任何部位进行输注、注射或植入。

[0040] 功能性特征,其是指包括由所述细胞进行并且可用于免疫治疗和干细胞治疗的各种功能,特别是免疫功能和分化功能。这些免疫功能可以包括,例如,分子分泌、细胞表面部分的表达、分子识别、对分子产生应答的能力和生长和 / 或改变成特定细胞类型或引起所述机体内其他细胞生长、改变、死亡或以某种方式改变正常或疾病功能以及其他本领域已知的免疫和细胞分化功能。所述免疫功能可以为参与先天免疫和 / 或适应性免疫系统应答或参与适应性或先天性免疫应答调节的过程、或过程的级联或分子的产生。所述功能可能涉及细胞介导的免疫功能和 / 或涉及体液免疫系统,涉及免疫刺激和免疫抑制功能。所述功能性特征可能涉及免疫记忆或涉及在自身和非自身抗原间进行区分、或者识别病原体 (例如细菌、病毒或真菌以及肿瘤) 或其他异常或不期望的细胞或组织。其他功能可能涉及表面分子,所述表面分子介导的功能包括:例如,将阻断、促进或以其他方式调节免疫应答或使分化为特定细胞类型的表面分子转运至特定器官或组织或部位。

[0041] 本发明描述了生物药物产品,所述生物药物产品包括作为活性成分配制在无营养的缓冲液中的活细胞。在一些实施例中,所述细胞为可以用于免疫治疗或干细胞治疗的活免疫细胞。在无营养的缓冲液中,所述组合物在室温下稳定至少约 6 小时,且在冷冻温度下稳定至少约 24 小时,优选地至少约 48 小时,和更优选地至少约 72 小时。令人惊奇地,所述组合物中的所述活细胞即使配制在无营养的缓冲液中后也可以维持其在含有营养成分的培养基中所表现出的特性、活性和功能性特征。本文所述的组合物可以被包装并利用商业快递在维持适当储存条件的容器中有利地从加工设施运送和配送至医疗点。这样的能力可以大量节省生产和给药包含活细胞的治疗组合物中的人力、时间和金钱。此外,由于加工设施可以生产、包装并配送所述细胞至世界上任何医疗点现场,活细胞治疗组合物对于患者的可达性大大提高了。

[0042] 本发明还描述了将活细胞悬浮液维持在无营养的缓冲液中一段较长时间的方法。所述方法包括将所述活细胞转移到无营养的缓冲液中并将它们储存在冷却器储存温度。在一些实施例中,所述活细胞组合物被储存在冷冻条件下。当需要时,将所述组合物从储存中取出,并在室温下放置一段时间。在一些实施例中,所述活细胞悬浮液在大约室温下经过一段时间的放置后,所述活细胞的所述功能性特征可以大体上被恢复。在另一些实施例中,所述活细胞悬浮液在生理条件下经过一段时间的放置后,所述活细胞的所述功能性特征可以

大体上被恢复。

[0043] 本文所述的治疗组合物包括活细胞。活细胞,是指经由诸如台盼蓝凸显 (trypan blue extrusion)、MTT 或 ATP 水平的生物性发光检测的适当测定技术所确定的多于 70% 的细胞是存活的,由此所述细胞能够在适当的条件下进行诸如扩增、分化和 / 或激活的体外操作。然而,所述组合物可以包括一些未激活的细胞、经过照射的细胞和 / 或无活性的细胞。所述活细胞可以来自多种来源包括,例如:永生化细胞株、原代细胞培养、生物体液、组织、脐带血、外周血、骨髓、细胞的等量分装冻存等。能够进行如上所述的体外操作的来自其他来源的活细胞也在本发明的范围内。

[0044] 所述治疗组合物中的所述细胞可以为同种异体细胞。例如,来自于同种异体供体的血液或骨髓的细胞可以以期望的方式进行加工,然后配制成用于输注到患者体内。被置于用于保持人体使用产品的注射器或转移包装或其他合适装置中的所述输制剂可以被包装并运送至医疗点现场为患者给药。可选地,所述治疗组合物中的所述细胞可以为自体同源细胞,所述自体同源细胞经过操作、配制、包装和运送,并且被回输到同一个患者体内。所述活细胞也可以来自于非人体来源,并经过操作、配制、包装和运送用于人体给药(异种)。所述用于对人体给药的相同的治疗组合物也可以用于非人类治疗和预防疾病的方案。

[0045] 在所述组合物中的所述活细胞为免疫细胞的实施例,这些免疫细胞可以包括来自于骨髓或脐带血、粒细胞(诸如嗜中性粒细胞、嗜碱性粒细胞和嗜酸性粒细胞)的细胞。所述免疫细胞也可以为单核细胞、巨噬细胞、树突细胞、天然杀伤细胞、淋巴细胞(B细胞、T细胞和 NKT 细胞)。T 细胞可以为,例如,CD4+ 细胞(包括 Th0、Th1、Th2、Th17 和 Treg 细胞)和 / 或 CD8+ 细胞(Tc1 和 Tc2)。

[0046] 一种用于增强受试者中细胞免疫应答的免疫治疗方法是被称为适应性免疫治疗的细胞治疗的类型。细胞治疗是活性成分全部或部分为活细胞的药物。适应性免疫治疗是涉及从受试者去除免疫细胞、体外加工(即,细胞的激活、纯化和 / 或扩增)和随后将所获得的细胞输注回到相同的受试者体内(自体同源治疗)或到不同的受试者体内(同种异体治疗)的细胞治疗。

[0047] 所述生物药物产品可以包括经过操作的活细胞,所述操作利用各种用于适应性免疫治疗的体外操作。经过体外操作的活细胞可以包括,例如,LAK 细胞(Rosenberg 美国专利号 4,690,915),TIL 细胞(Rosenberg 美国专利号 5,126,132),细胞毒性 T 细胞(蔡等,美国专利号 6,255,073;Celis 等,美国专利号 5,846,827),扩增的肿瘤引流淋巴结细胞(Terman 美国专利号 6,251,385),淋巴细胞的各种制剂(Bell 等,美国专利号 6,194,207;Ochoa 等,美国专利号 5,443,983;Riddell 等,美国专利号 6,040,180;Babbitt 等,美国专利号 5,766,920;Bolton 美国专利号 6,204,058),CD8+TIL 细胞(Figlin 等(1997) Journal of Urology 158:740),在 IL-2 存在下以抗 CD3 单克隆抗体激活的 CD4+T 细胞(Nishimura(1992) J. Immunol. 148:285),在 IL-2 存在下用抗 CD3 和抗 CD28 共激活的 T 细胞(Garlie 等,(1999) Journal of Immunotherapy 22:336),在 IL-2 存在下体外产生并以抗 CD3 和抗 CD28 单克隆抗体(mAb)扩增的抗原特异性 CD8+T 细胞(Oelke 等,(2000) Clinical Cancer Research 6:1997),和注射混有卡介苗(BCG)的经过照射的自体同源肿瘤细胞以便对受试者进行接种,7 天后引流淋巴结 T 细胞随后恢复,引流淋巴结 T 细胞以抗 CD3 单克隆抗体激活,接着在 IL-2 中扩增(Chang 等,(1997) Journal of Clinical Oncology 15:796)。

[0048] 在一个示例性的实施例中,本发明的治疗组合物包括至少一些 T 细胞,优选地包括同种异体 T 细胞。这些 T 细胞还优选通过细胞表面激活而被激活,以形成激活的 Th1 记忆细胞。所述 T 细胞可以以各种方式被激活,包括通过使用特异性针对 T 细胞表面分子的固定化单克隆抗体。适当经过激活的 T 细胞,例如描述于美国专利号 7,435,592 中并以通过参照并入本文。所述细胞优选地具有细胞表面部分,所述细胞表面部分通过单克隆抗体或其他结合试剂而交联。这些单克隆抗体和 / 或结合试剂优选地通过,例如固定在固体表面上而交联,从而激活所述 T 细胞。这些在本文中被称为在培养基中激活的细胞 (CAC)。这些体外制备的 CAC 可以进行冷冻以供将来使用或配制成用于输注。

[0049] 在优选的实施例中,所述体外制备的 CAC 冷冻储存,直到对患者给药所需。对患者给药前,所述 CAC 被复苏、洗涤并在营养培养基中通过所述细胞表面结合部分的交联而再激活,其中所述细胞表面结合部分 (诸如 CD3 和 CD28) 被描述于例如美国专利号 7,402,431 (通过参照并入本文) 中。所述 CAC 与所述交联剂一起然后可以被洗涤并转移至无营养的缓冲液,例如制剂缓冲液。所述制剂缓冲液中再激活的细胞在此称为制剂缓冲液中的细胞 (CFB)。所述 CFB 可以为了治疗目的对患者给药。通常地,这些再激活的细胞,一旦被转移至无营养的缓冲液中,具有有限的保存期限。活细胞可以以至少约  $10^6$  个细胞 / 毫升的密度进行配制,优选地以至少约  $10^7$  个细胞 / 毫升以上的密度进行配制。在一些实施例中,所述活细胞可以以至少约  $10^8$  个细胞 / 毫升以上的密度进行配制。所述细胞的具体浓度可以通过细胞的具体用途和治疗方案确定。

[0050] 所述治疗组合物还可以包括许多其他成分。这些成分可以包括,例如,使所述活细胞保持在所期望的激活状态的试剂。在一个示例性的实施例中,所述治疗组合物可以包括使所述 T 细胞保持在被激活的状态的试剂,例如以下描述于实施例中的 Dynabeads ClinExVivo™。

[0051] 本发明包括储存和加工所述活细胞组合物以增加所述保存期限的方法。本文所使用的保存期限被定义为配制后所述 CFB 维持活性、预定义的特性和功能性特征的时间量。通常地,所述细胞被转移至适合输注至患者体内的无营养的缓冲液中。本文所提到的无营养的缓冲液是任何类型的缺少适当的成分以支持细胞增殖和 / 或扩增的培养基、缓冲液或其他液体。所述无营养的缓冲液通常是等渗的 USP 无菌且无热源的,含有所述适当的成分和 / 或缓冲系统以维持活细胞完整,并且被获许用于人体非胃肠道用途。在一个示例性实施例中,所述无营养的缓冲液为由 Plasmalyte A (Baxter Scientific, Deerfield, IL) 和 1% 人血清白蛋白 (McKesson, San Francisco, California) 组成的制剂缓冲液。

[0052] 在具有被激活的细胞 (特别是被激活的 Th1 细胞) 的实施例中,即使在所述细胞被转移至所述无营养的缓冲液中时,对细胞的激活信号也会维持。例如,在所述细胞通过细胞表面结合部分交联而被激活的实施例中,所述交联优选地维持在无营养的缓冲液中。在储存过程中所述交联的维持对于从储存中取出后所述组合物功能性特征的恢复可以是决定性的。无营养的缓冲液中去除了激活成分的细胞组合物不能以与维持被激活状态的细胞相同的方式恢复。

[0053] 本文所述的方法也包括在活细胞被转移至无营养的缓冲液中后该细胞的加工方法。所述活细胞组合物可以被转移至具有用于储存的冷却器温度的环境中,以便增加所述组合物的保存期限。在无营养的缓冲液中的所述细胞被转移至的冷却器温度在本文中称为

储存温度。通常地所述细胞在被置于所述无营养的缓冲液中后尽可能迅速地被转移至储存温度。优选地,所述细胞在被置于所述无营养的缓冲液中后在小于约 6 小时内,更优选地在被置于所述无营养的缓冲液中后在小于约 4 小时内被转移至所述储存温度。在甚至更优选的实施例中,所述细胞在被置于所述无营养的缓冲液中后在小于约 1 小时内被转移至所述储存温度。

[0054] 所述组合物可以保持的储存温度是不同的,但通常低于生理温度,即低于约 37 摄氏度。优选地,所述细胞被储存在冷藏温度下。冷藏温度可以在约 -2 摄氏度和约 12 摄氏度的范围内。更优选地,所述细胞被储存在约 0 摄氏度以上和约 10 摄氏度范围的温度下。最优选地,所述细胞被储存在约 4 摄氏度和约 8 摄氏度范围的温度下。

[0055] 本文所述的组合物也可以被包装,并且从制造或加工设施运送和配送至医疗点现场。制造或加工设施可以为诸如医院、诊所或任何遵守既定准则可以处理用于生物药物的活细胞的生产设施的设施。医疗点可以是医院、诊所或任何其它通常给予患者护理的场所。通常地,用于运送的组合物以维持所述组合物在如上所述的储存温度范围内的方式进行包装。所述细胞可以储存于各种容器中并进行运送。所述细胞可以被储存于,例如软质容器、注射器等,并进行运送。在运送时,所述诸如注射器的容器可以被置于例如保温盒的包装中。在所述具有活细胞的容器被置于所述包装中前,优选地,所述包装或保温盒在所述期望的储存温度下进行预处理。例如,所述组合物可以被包装于冰或气凝胶包装盒中。优选地,所述包装为能够维持所述期望储存温度的保温盒,而不受外部温度的影响。优选地,预处理所述保温盒,所述预处理是指将所述具有活细胞的容器置于所述保温盒内前,所述保温盒已经被储存或设置在所述期望的储存温度下。在优选的实施例中,放置所述生物产品前所述包装进行预处理,并且所述包装在冷藏或冷冻条件下被运输至所述医疗点。可以使用任何形式的运送方法,而在示例性的实施例中是通过商业快递运送的。

[0056] 当所述组合物被储存于所述储存温度范围内时,本文所述的组合物的保存期限可以令人惊奇地延长。所述活细胞组合物的保存期限可以延长至超过约 6 小时。优选地,所述活细胞组合物的保存期限可以延长至超过约 24 小时,更优选地,至超过约 48 小时。在甚至更优选的实施例中,所述组合物的保存期限可以延长至长达约 72 小时。在最优选的实施例中,所述保存期限可以延长至长达约 120 小时。超过约 120 小时的保存期限也在本发明的范围内。

[0057] 在无营养的缓冲液中根据本文所述方法储存的细胞组合物可以在储存期间和从储存中取出后维持其活性、特性和功能。所述细胞的活性可以通过本领域已知的各种方法确定,该方法包括诸如台盼蓝凸显、MTT、7-氨基-放线菌素 D 或 ATP 水平的生物性发光检测的测定技术。

[0058] 所述细胞的特性可以通过各种方法确定。在所述组合物中的细胞可以用指示该特定细胞类型的各种外部和内部细胞标记物进行测定。外部标记物依据单克隆抗体的聚类设计进行分类(在第一届到第八届的国际人类白细胞分化抗原研讨会上分化聚类(CD)被指定为总共有 247 个 CD)。白细胞在其细胞表面表达不同的分子种类,其中许多分子种类反映其不同阶段的谱系特异性分化或不同状态的激活或灭活。白细胞表面分子通常用抗白细胞-单克隆抗体(mAbs)进行检测。利用单克隆抗体的不同组合,可以绘制出不同白细胞亚群的细胞表面免疫表型,包括 B 细胞、辅助 T 细胞(Th)、细胞毒性 T 细胞(Tc)和天然杀伤

(NK) 细胞的在功能性上不同的成熟淋巴细胞亚群。

[0059] 即使储存于无营养的培养基中后,所述组合物中的活细胞也表现出配制在所述无营养的培养基前所出现的功能性特征。功能性特征可以包括各种活性,包括:例如,诸如 CD40L、FasL、穿孔素和粒酶 B 的功能性分子,共刺激分子 4-1BBL、CD28、CTLA4 和肿瘤坏死因子-相关的激活诱导的细胞因子 (TRANCE), TWEAK, PD-1, B7 家族,诸如整合素、钙粘素和选择素的粘附分子的表达;以及各种细胞因子和趋化因子的分泌;和这些细胞因子和趋化因子受体的表达。细胞因子和趋化因子是具有生长、分化和激活功能的过多分泌的蛋白,其中该蛋白可以调节和确定免疫应答性质并控制免疫细胞转运和免疫器官的细胞排列。细胞因子可以包括,例如, IL2、IL3、IL4、IL5、IL6、GMCSF、IFN- 伽马等。

[0060] 在一些实施例中,在配制后和整个储存期间所述功能性特征被保持,并且在从储存中取出或运送后所述酶或标记物的水平可以迅速被测定。例如,所述 CD40L 的表达可以在所述组合物从储存中取出并允许在室温下孵育约 2 小时后进行测定。所述 CD40L 的表达量可以与配制和储存时的 CD40L 表达水平相近似。例如,参见图 2A-2C。类似地,所述组合物中存活细胞的数量可以在从储存中取出并在室温下孵育约 2 小时后进行确定。所述存活细胞的数量可以与配制和储存时的细胞活性水平相近似。例如,参见图 3A-3C。

[0061] 在另一些实施例中,所述功能性特征可以在将所述细胞暴露于生理条件后恢复。这可以表明,输注到患者体内时,所述细胞组合物可以实现预期的功能,并且分泌或表达在配制时所述细胞的成分特征。例如,当所述细胞被配制并置于储存状态下时,IFN- $\gamma$  的分泌可以被抑制。IFN- 伽马在本文中被称为 IFN- $\gamma$  或 IFN-g。所述细胞返回到室温并不能恢复 IFN-g 的分泌,然而将所述细胞在 37 摄氏度孵育 24 小时增加了所述 IFN- $\gamma$  的分泌水平,该分泌水平类似于配制时的水平。例如,参见图 12D、13D 和 14D。有利地,储存过程中所述 IFN- $\gamma$  水平的降低可以阻止细胞资源的衰竭。如果在储存过程中所述用于分泌的细胞资源被充分保留,那么所述细胞通常可以在适当的生理条件下重新启动所述 IFN- $\gamma$  的分泌。由此,尽管所述组合物在给药前已经被储存了较长的时间,对患者给药所述组合物后仍然可以为患者提供所述 IFN- $\gamma$  和由于给药所述治疗组合物所获得的其他炎性细胞因子。

[0062] 所述组合物的保存期限的延长可以通过各种方式证明。如本文所使用的,保存期限的延长可以指所述组合物中的活细胞即使在如上所述较长的储存时间后维持其活性、特性和其功能性特征。通常地,在储存至少 24 小时后,所述组合物在无营养的缓冲液中维持定义性特征的相对于配制时所述活性的至少约 50% 的活性。在储存后相对于配制时的所述活性,优选地维持至少约 75% 的活性,更优选地维持至少约 85% 的活性,再更优选地维持至少约 90% 的活性。

[0063] 在优选的实施例中,储存至少 48 小时后,所述组合物在无营养的缓冲液中维持定义性特征的相对于配制时所述活性的至少约 50% 的活性。在储存后相对于配制时的所述活性,优选地维持至少约 75% 的活性,更优选地维持至少约 85% 的活性,甚至更优选地维持至少约 90% 的活性。

[0064] 在更优选的实施例中,储存至少 72 小时后,所述组合物在无营养的缓冲液中维持定义性特征的相对于配制时所述活性的至少约 50% 的活性。在储存后相对于配制时的所述活性,优选地维持至少约 75% 的活性,更优选地维持至少约 85% 的活性,甚至更优选地维持至少约 90% 的活性。

[0065] 所述细胞组合物可以通过各种方法对患者给药。所述组合物可以通过皮下、静脉内、鞘内、肿瘤内和其他类似途径进行给药。

[0066] 实施例

[0067] 材料:PE 缀合的 CD40L 购自 Beckman Coulter, Brea, CA。7-氨基-放线菌素 D(7-AAD)(1000x) 购自 Cayman Chemical Co., Ann Arbor, MI。PlasmaLyte A 购自 Baxter Scientific, Deerfield, IL。人血清白蛋白(HSA) 购自 McKesson, San Francisco, California。FcR 结合抑制剂购自 eBioscience, San Diego, CA。免疫磁珠 ClinExVivo™ 购自 Invitrogen, Carlsbad, CA。

[0068] 制剂缓冲液中的细胞(CFB)的制备-培养基中激活的细胞(CAC)被置于 cRPMI 培养基中进行洗涤。记录表示所述配制方案的开始时间。将 cRPMI 培养基中的细胞进行离心,去除上清液并将所述细胞重悬在 cRPMI 缓冲液中。利用台盼蓝测定法确定细胞活性。所述活细胞的总细胞数和浓度被用于确定存活细胞的百分比。如果所述样品具有超过 80% 的细胞活性,那么用于细胞再激活和配制的程序继续进行。

[0069] 所述 CAC 细胞以  $1 \times 10^7$  个细胞/毫升的浓度进行重悬。以  $1 \times 10^7$  个细胞/毫升的活细胞浓度进行再激活。根据体积在 24 孔板、6 孔板或 75 厘米<sup>3</sup> 的培养瓶中进行再激活。加入免疫磁珠 ClinExVivo™ CD3/CD28 以便再激活所述细胞,并且在 36 ~ 38 摄氏度和 5% CO<sub>2</sub> 条件下孵育 4 小时。在孵育约 4 小时后,将所述细胞取出并转移至 50 毫升的管子中,其中所述 50 毫升的管子具有最终配制的缓冲液(FFB)。FFB 为 PlasmaLyte A 与 1% 的 HAS。将所述经过再激活的细胞进行离心,去除上清液后重悬在 FFB 中。这些被称为配制缓冲液中的细胞(CFB)。

[0070] 将 CFB 以  $10^7$  个细胞/毫升的浓度重悬于 FFB 中。将所述 CFB 重悬用于 ID、IT 或 IV 给药。将 1 毫升的所述细胞悬浮液加入到 3 毫升规格的注射器中作为 ID 制剂。IT 和 IV 制剂分别为 3 毫升和 5 毫升。具有适当制剂的所述注射器储存于约 4 摄氏度的平均冷藏温度。

[0071] 收集储存后的样品-在不同的时间点收集所述细胞和上清液。所述时间点如下:0(起始)、室温(RT)下 2 小时、4 摄氏度下 48 小时、和 4 摄氏度下 48 小时以及随后的室温下 2 小时。

[0072] 在每一个时间点,收集 100 微升细胞悬浮液,然后将所述细胞在 4 摄氏度下以 400g 的速度旋转 5 分钟。然后将上清液转移至另一个管子中用于稍后利用 ELISA 检测 IFN- $\gamma$ 。将所述细胞重悬于 150 微升染色缓冲液中用于流式细胞术。在一些实验中,将所述细胞重悬于 100 微升 cRPMI 培养基并在 37 摄氏度 5% CO<sub>2</sub> 的培养箱中培养 24 小时。24 小时后取出上清液,通过 ELISA 检测 IFN- $\gamma$ 。

[0073] 流式细胞术(CD40L 和 7-AAD)-将以上获得的 150 微升细胞悬浮液中的 50 微升转移至 3 只离心管中,并将 3 只离心管分别标记为未染色、CD40L 和 7-AAD。将标记为未染色的离心管在冰上孵育 20 分钟。对于标记为 CD40L 的离心管,依据生产商的说明书将所述细胞与 FcR 结合抑制剂在冰上预先孵育 20 分钟。然后将 40 微升染色缓冲液(PBS+1% FBS)和 10 微升 PE-CD40L 抗体加入至所述细胞悬浮液中,并于暗室中在冰上再孵育 20 分钟。

[0074] 利用 7-AAD 的流式细胞术检测细胞活性。7-AAD 嵌入到死细胞或受损细胞的 DNA 中,由此,确定 7-AAD 阳性细胞是细胞活性的指标。对于标记为 7-AAD 的离心管,该离心管

在 6 摄氏度下以 400g 的速度离心 5 分钟。去除上清液后,将所获得的细胞颗粒重悬于 100 微升  $1\times$  的 7-AAD 溶液中。将该离心管于暗室中在冰上孵育 15 分钟。将 1 毫升染色缓冲液加入到标记为 CD40L 的离心管,然后将 3 个离心管一起进行离心。去除上清液后,将所获得的细胞颗粒重悬于 0.4 毫升的染色缓冲液,并运行 FACS。

[0075] INF- $\gamma$  ELISA-利用 INF- $\gamma$  sandwich ELISA 试剂盒 (R&D Systems, Mpls. MN), 依据生产商的说明书确定所述上清液中分泌的 INF- $\gamma$ 。

[0076] 实施例 1- 进行本实验是为了确定配制缓冲液中的细胞 (CFB) 运输后在低温下是否稳定。将几批细胞悬浮液配制于 FFB 中,并通过快递服务 (联邦快递) 进行运输。利用数据记录仪监测温度。监测没有经过预处理的盒内和经过预处理的气凝胶保温盒内的温度变化。同时监测其外部的温度。配制并运输不同的 3 批。上清液样品取自在培养基中激活的细胞 (CAC)、配制后即刻的 CFB、室温 (RT) 下 2 小时后的 CFB、4 摄氏度下 48 小时后的 CFB、和 4 摄氏度下 48 小时然后室温 (RT) 下 2 小时后的 CFB。检测 CAC 的 CD40L 表达,并检测剩余细胞的 CD40L 表达和细胞活性。

[0077] 图 1A 和图 1B 显示了所述细胞在运输过程中所处的温度。图 1A 显示出当样品没有被包装于预处理的盒中时,其温度在约 48 小时内从约 5 摄氏度变化至约 13.7 摄氏度。所述样品是稳定的,说明温度的较大波动是可接受的。图 1B 显示出所述预处理保温盒内部的温度保持得相当稳定。该温度从 0.2 摄氏度变化至 2.2 摄氏度。图 1C 显示了在所述运送期间外部温度的变化。

[0078] 图 2A-2C 显示了 CD40L 的表达并没有太大变化。图 3A-3C 显示出运送过程后的细胞活性与运送前的细胞活性相似。这些结果表明将所述治疗组合物保持在如约 2 摄氏度至约 13 摄氏度的宽范围内的包装中是没有伤害的。

[0079] 实施例 2- 进行这项研究是为了确定所述低温是否可以延长 CFB 的有效期。在室温下进行 CFB 不同制剂的稳定性研究。将 CFB 配制成为如上所述的用于皮下给药 (ID)、肿瘤内给药 (IT) 和静脉内给药 (IV)。检测这些制剂的稳定性是为了看出低温稳定性是否可以被延长。

[0080] 将几批 HTC264、HTC245 和 HTC273 配制为用于 ID、IT 和 IV,并在配制后室温下 6 小时后检测其 CD40L 的表达、细胞活性和 INF- $\gamma$  的分泌。图 6A-6C、图 7A-7C 和图 8A-8C 显示了这些检测的结果。所有这三个参数在室温下 6 小时后是稳定的。图 9A-9C 显示了在 4 摄氏度下储存 48 小时后 CD40L 的表达是稳定的。图 11A-11C 表明在 4 摄氏度下储存 48 小时后所述细胞活性是稳定的。图 10A-10C 表明在 4 摄氏度下储存 48 小时后 INF- $\gamma$  的分泌并不恢复。然而如下所示其可以通过转移回 RPMI 并在 37 摄氏度孵育 24 小时而恢复。

[0081] 将 3 批 HTC264、HTC245 和 HTC273 配制为 ID、IT 或 IV 制剂形式。每种制剂形式制备成总共 4 个注射器 (1 只室温、1 只 4 摄氏度下储存 24 小时、1 只 4 摄氏度下储存 48 小时、1 只 4 摄氏度下储存 72 小时),并在 4 摄氏度下孵育不同的时间。孵育后收集上述样品,并回到室温下 2 小时。以下表 1 显示了时间点、样品和对每一批细胞进行的检测。并且当所述细胞在 37 摄氏度下孵育 24 小时后确定 INF- $\gamma$  水平。

[0082] 表 1

[0083]

时间	样品	检测
-4h	CAC	CD40L
0	CFB, 上清液	CD40L, IFN- $\gamma$ , 活性
2h	CFB, 上清液	CD40L, IFN- $\gamma$ , 活性
24h4°C	CFB, 上清液	CD40L, IFN- $\gamma$ , 活性
24h4°C -2h RT	CFB, 上清液	CD40L, IFN- $\gamma$ , 活性
48h4°C	CFB, 上清液	CD40L, IFN- $\gamma$ , 活性
48h4°C -2h RT	CFB, 上清液	CD40L, IFN- $\gamma$ , 活性
72h4°C	CFB, 上清液	CD40L, IFN- $\gamma$ , 活性
72h4°C -2h RT	CFB, 上清液	CD40L, IFN- $\gamma$ , 活性

[0084] 图 12A-12D、图 13A-13D 和图 16A-14D 分别显示了几批 HTC264、HTC245 和 HTC273 的结果。对这几批的皮下给药制剂进行如上所示的检测。该结果显示了将所述 CFB 保持在 4 摄氏度可以在 72 小时后于所述细胞表面维持 CD40L 的表达（图 12A、图 13A 和图 16A）。该细胞活性并没有受到低温储存的太大影响（图 12B、图 13B 和图 16B）。当所述细胞回到室温仅仅 2 小时后，所述 IFN- $\gamma$  分泌的水平被抑制（图 12C、图 13C 和图 16C）。然而，当所述细胞被转移回 RPMI 培养基中并在生理温度（37 摄氏度）下孵育 24 小时后，所述 IFN- $\gamma$  水平恢复（图 12D、图 13D 和图 14D）。这表明了所述细胞在低温下保持 72 小时后仍然可以分泌 IFN- $\gamma$ 。这暗示了如果治疗性给药这些细胞，可以在患者体内产生 IFN- $\gamma$ ，其水平与没有经过长期储存的细胞相似。

[0085] 实施例 3- 进行本实验是为了比较 CAC 细胞和 CFB 细胞的稳定性。将三批不同的细胞配制为 1D 注射器。对于每一批细胞，一个注射器用于 CAC，而另一个注射器用于 CFB。复苏 CAC，并用 cRPMI 进行洗涤。细胞计数后，用 FFB 以  $10^9$  个细胞 / 毫升的密度重悬所获得的细胞颗粒，并将 1 毫升的细胞悬浮液转移至 3 毫升的注射器中。对于 CFB，用 cRPMI 以  $10^9$  个细胞 / 毫升的密度重悬所获得的细胞颗粒，并与抗 -CD3/ 抗 -CD28 珠子混合。将上述细胞和珠子的混合物在 37 摄氏度 5% CO<sub>2</sub> 条件下孵育 4 小时。用 FFB 洗涤所述细胞，并用 FFB 以  $10^7$  个细胞 / 毫升的密度进行重悬。将上述细胞悬浮液转移至 3 毫升的注射器中。在每个时间点，从所述注射器中获取 100 微升的样品用于 CD40L、IFN- $\gamma$ 、活性检测。在 4 摄氏度下孵育 48 小时后，以 400g 的速度将一些样品进行离心 5 分钟以去除 FFB。弃上清液后，将所获得的细胞颗粒重悬于 100 微升的 cRPMI 中，并在 37 摄氏度 5% CO<sub>2</sub> 条件下孵育 2 小时。所收集的上清液用于 IFN- $\gamma$  检测。下表 2 列出了所收集的样品和进行的检测。

[0086] 表 2

[0087]

时间	样品	检测
0	CAC, 上清液	CD40L, IFN- $\gamma$ , 活性
2h, RT	CAC, 上清液	CD40L, IFN- $\gamma$ , 活性
48h, 4°C	CAC, 上清液	CD40L, IFN- $\gamma$ , 活性
48h 4°C -2h RT	CAC, 上清液	CD40L, IFN- $\gamma$ , 活性
0	CFB, 上清液	CD40L, IFN- $\gamma$ , 活性
2h, RT	CFB, 上清液	CD40L, IFN- $\gamma$ , 活性
48h, 4°C	CFB, 上清液	CD40L, IFN- $\gamma$ , 活性
48h, 4°C -2h RT	CFB, 上清液	CD40L, IFN- $\gamma$ , 活性

[0088] 上述结果表明在 4 摄氏度下对 CAC 孵育 48 小时显著降低细胞表面上的 CD40L 表达, 参见图 15A-15C。然而, 在 4 摄氏度下对 CFB 孵育 48 小时可以维持所述 CD40L 表达, 这暗示了 CD3 和 CD28 的交联对于所述细胞的稳定性是至关重要的。即使在 4 摄氏度下孵育 48 小时后, CFB 也可以维持活性并分泌大量的 IFN- $\gamma$ 。参见图 16A-C 和图 17A-C。

[0089] 实施例 4- 进行这项研究是为了确定经过配制的 CFB 在包装和从处于耶路撒冷, 以色列的生产设施运送至医疗点后的稳定性。确定 CFB 产品在 72 小时运输过程后满足预先确定的特性和功能性特征是非常重要的, 因为在所述配制过程结束时, 上述细胞被转移至无营养的输注缓冲液中, 而所述细胞在该无营养的输注缓冲液中可能丧失其活性和独特特性以及功能性特征。已知的是低温可以减缓基因表达和细胞活性, 并且该基因表达可以通过将细胞返回生理温度而恢复。出于这个原因, 利用预先验证的、冷藏的、控温的容器进行运送。

[0090] 通过将运输前细胞特征 (在基线 - 激活 4 小时后配制的注射器 = FF) 与运送至纽约并返回后获得的 (在 FF 完成后最少 72 小时) 相比较, 检测 CFB 细胞以检查在 72 小时运输过程后是否维持其预先定义的特性和功能性特征。

[0091] 预先定义的终点参数为:

[0092] 1、活性检测: 在所有检测时间点 CFB 活性必须大于 70% 活细胞。

[0093] 2、内毒素快速检测: 在基线和于 4 摄氏度下储存 72 小时后所收集的样品的内毒素水平必须低于 0.5Eu/ml。

[0094] 3、革兰氏染色: 在所有检测时间点所收集的样品的载玻片上不能观察到细菌。

[0095] 4、表面染色: CD40L AM (CFB-CAC)  $\geq 30$ 。

[0096] 5、USP 无菌: 所有检测的培养基中配制的样品没有生长。

[0097] 6、通过 ELISA 检测 IFN  $\gamma$  分泌:

[0098] 6.1 在 4 小时激活过程中积累的 IFN  $\gamma$  大于 1000pg IFN  $\gamma$  每  $1 \times 10^6$  个细胞;

[0099] 6.2 基线后在 24 小时过程中积累的 IFN  $\gamma$  大于 6000pg 每  $1 \times 10^6$  个细胞;

[0100] 6.3 在 2 摄氏度至 8 摄氏度储存 72 小时后在 24 小时过程中积累的 IFN $\gamma$  大于 6000pg 每  $1 \times 10^6$  细胞。

[0101] 结果：

[0102] 依剂量将每批 HTC300 进行 3 种独立的最终配制过程。包装于注射器中所配制的产品以 Flying Cargo (FC) 运送至 NY 并返回耶路撒冷, 以色列。

[0103] 将运输中的注射器从配制结束的时间长达 72 小时保持在 2-8 摄氏度, 如运送包装内的温度记录器所显示的。所有结果总结在表 3 中。

[0104] 表 3

[0105]

制剂编号	细胞类型/时间	细胞活性	CD40LAM CFB-CAC	IFN $\gamma$ (pg/10 <sup>6</sup> 个细胞)	内毒素 (EU/ml)	革兰氏染色	无菌	合格/不合格
HTC300 T7-71+72	CAC	97.95%						合格
	CFB 基线	90.91%	143.60	8,027	<0.2	合格	合格	
	于 cRPMI 中在 37 摄氏度下 24 小时后			45,741				
	在 4 摄氏度下 72 小时后	90.24%	192.02		<0.277	合格		
	于 cRPMI 中在 37 摄氏度下 24 小时后			28,955				
HTC300 T7-73+74	CAC	99.40%						合格
	CFB 基线	98.23%	117.64	6,215	<0.219	合格	合格	
	于 cRPMI 中在 37 摄氏度下 24 小时后			31,155				
	4 摄氏度下 72 小时后	95.65%	166.52		<0.208	合格		
	于 cRPMI 中在 37 摄氏度下 24 小时后			13,284				
HTC300 T7-77+78	CAC	98.45%						合格
	CFB 基线	97.61%	165.39	8,960	<0.208	合格	合格	
	于 cRPMI 中在 37 摄氏度下 24 小时后			42,520				
	4 摄氏度下 72 小时后	92.81%	231.50		<0.2	Pass		
	于 cRPMI 中在 37 摄氏度下 24 小时后			22,583				

[0106] 可以从表 3 中看出,所有配制的三批都通过了预先定义的验收标准,因此证明了在所建议的配送条件下 CFB 的稳定性。

[0107] 尽管本发明已经参照优选的实施方式进行了描述,本领域的技术人员将能认识到在不脱离本发明的精神和范围的情况下在形式和细节上进行变化。

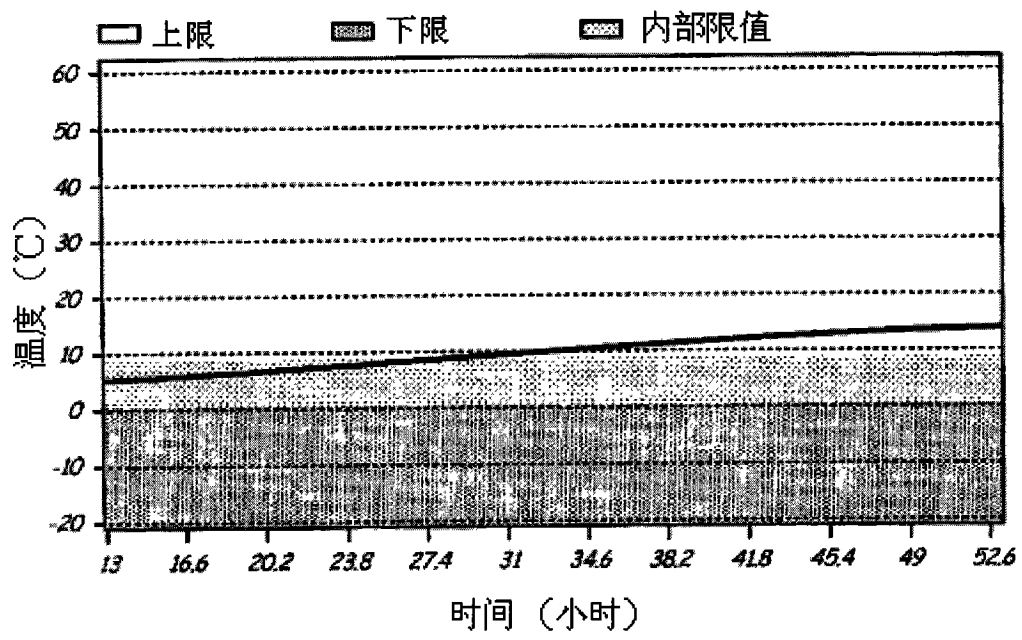


图 1A

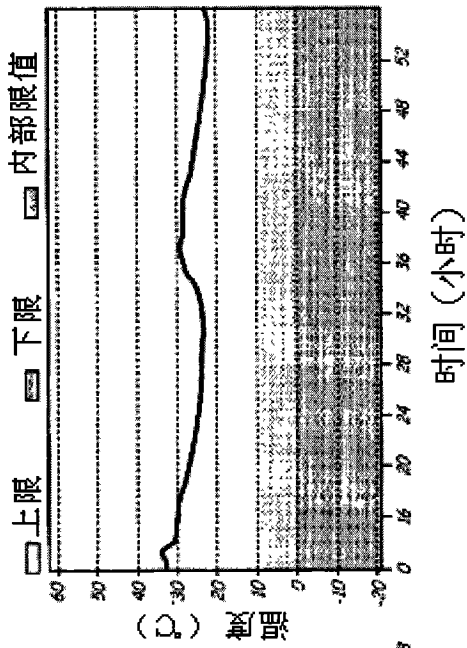


图1C

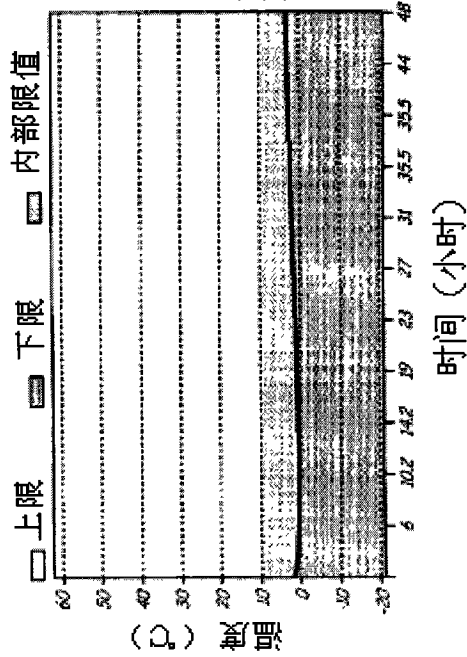


图1B

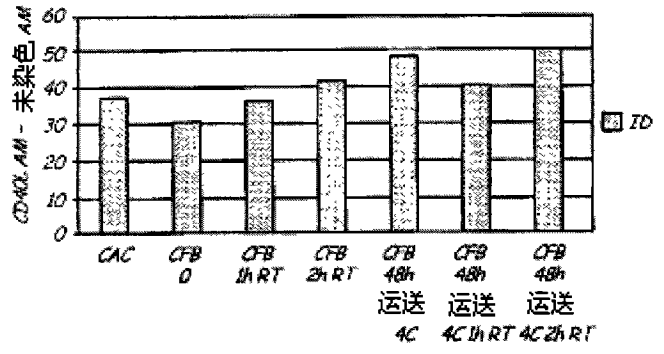


图 2A

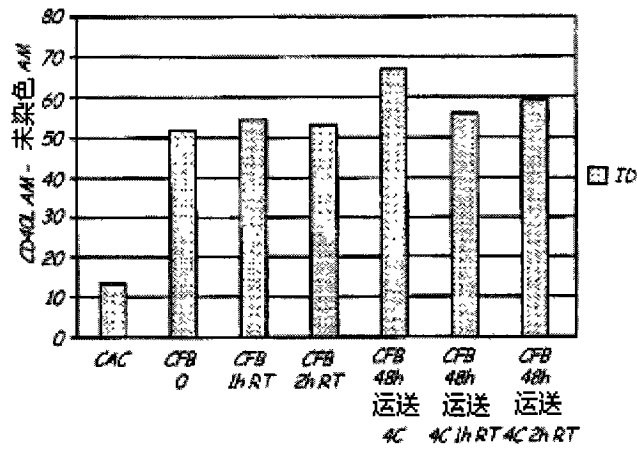


图 2B

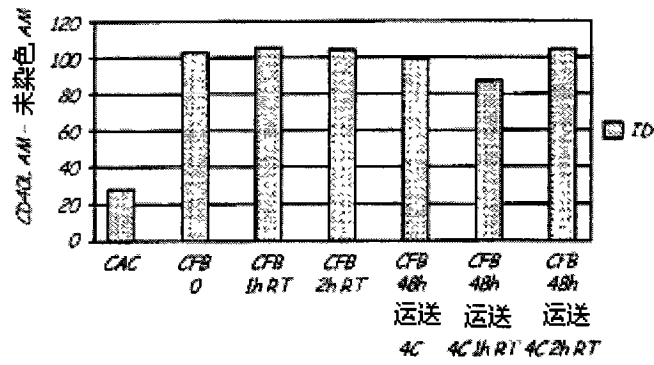


图 2C

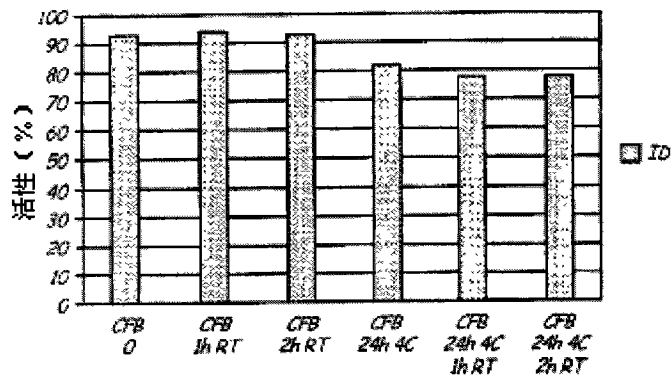


图 3A

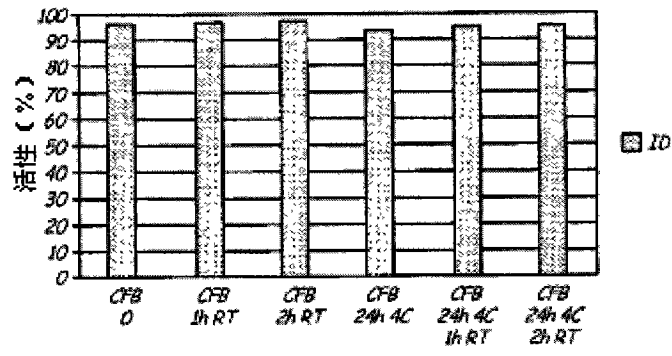


图 3B

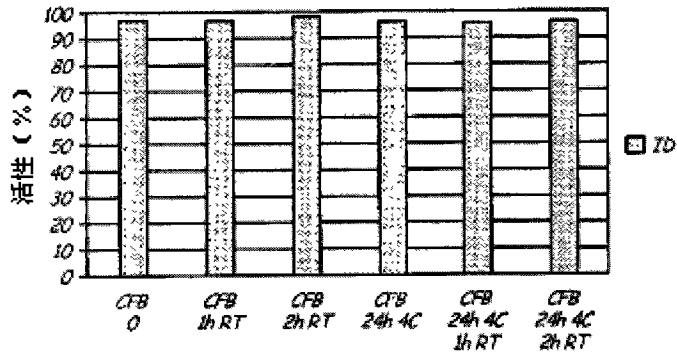


图 3C

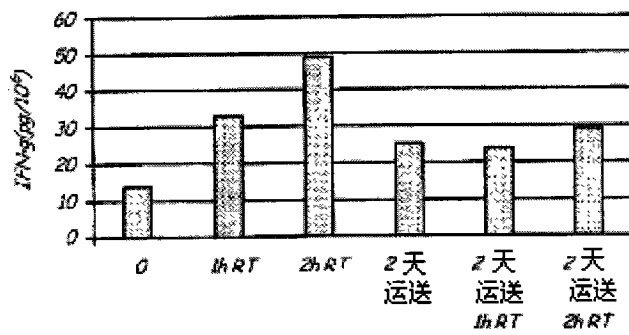


图 4A

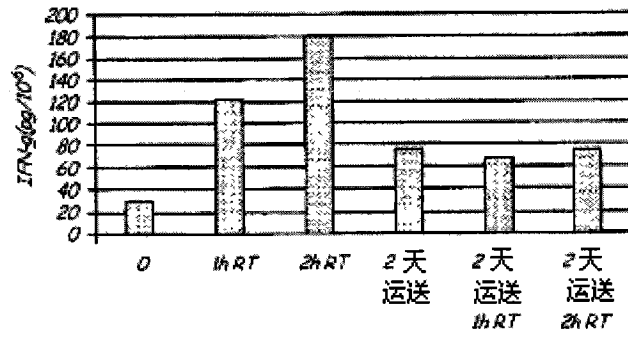


图 4B

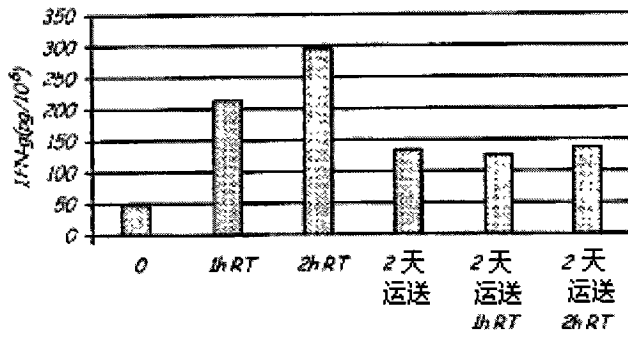


图 4C

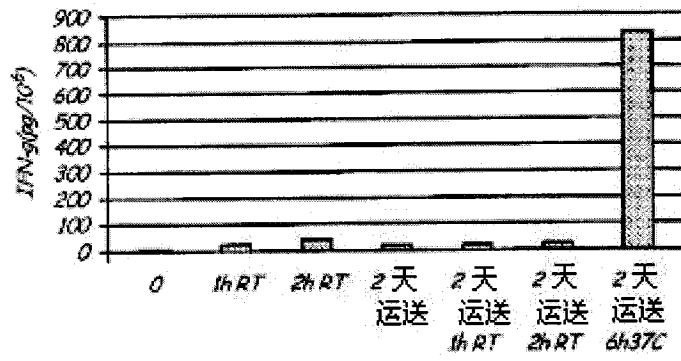


图 5A

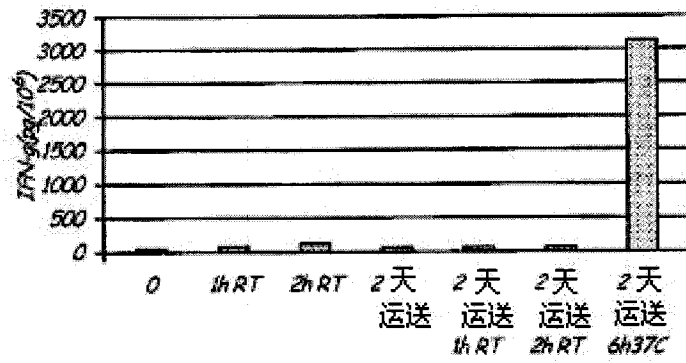


图 5B

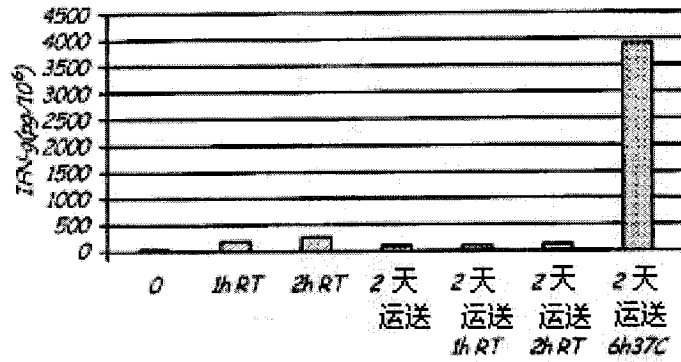


图 5C

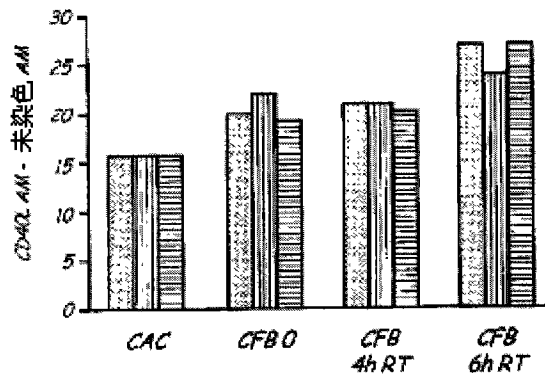


图 6A

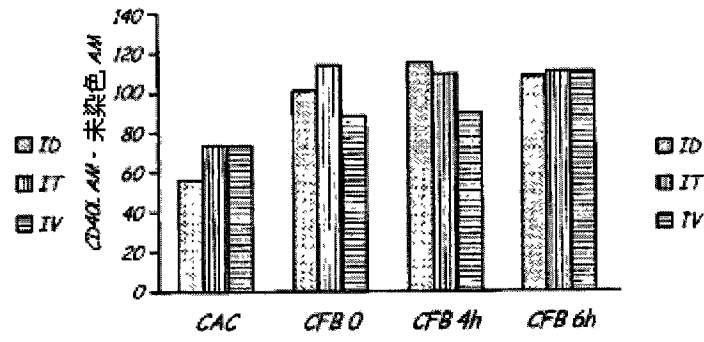


图 6B

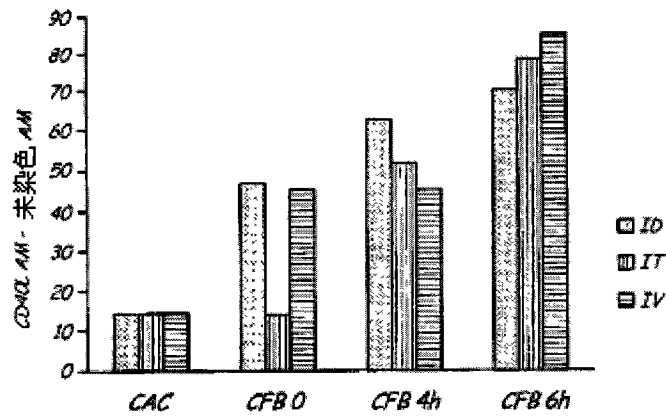


图 6C

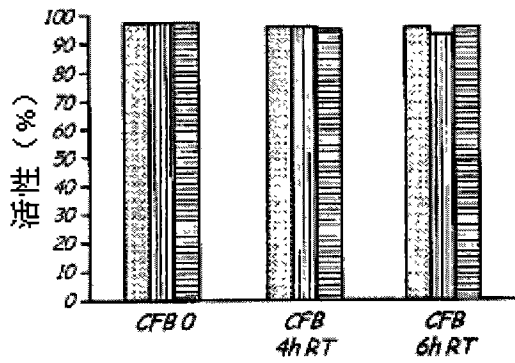


图 7A

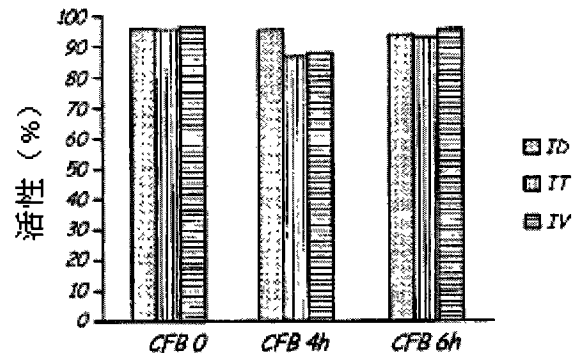


图 7B

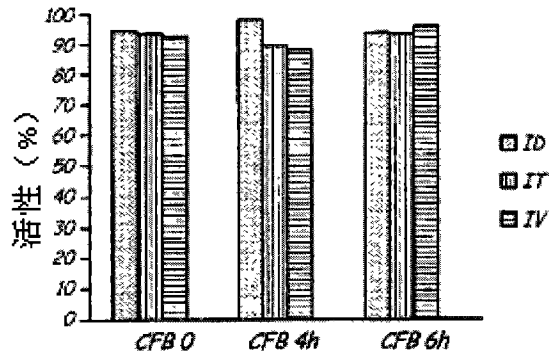


图 7C

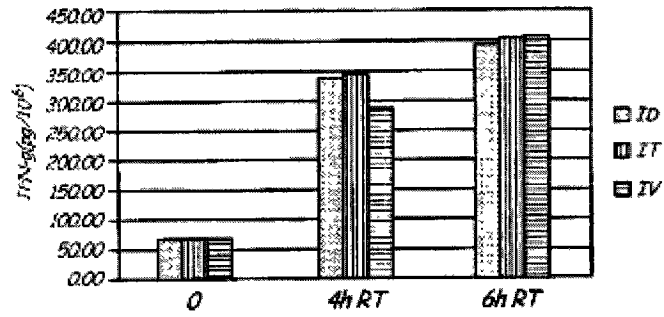


图 8A

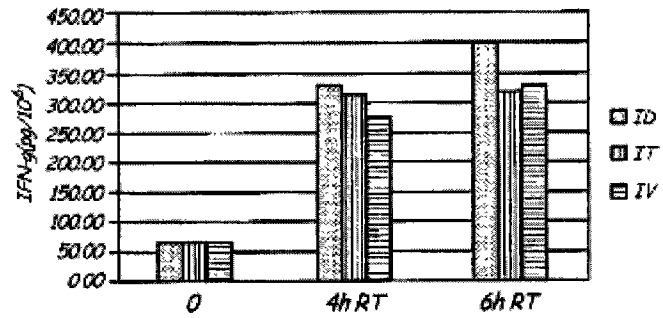


图 8B

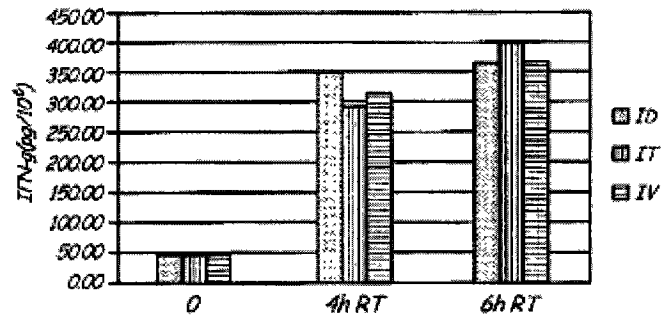


图 8C

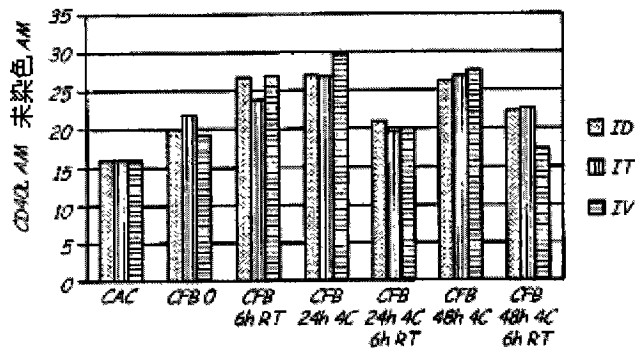


图 9A

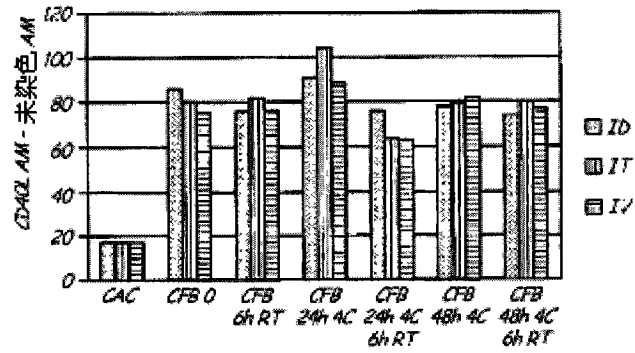


图 9B

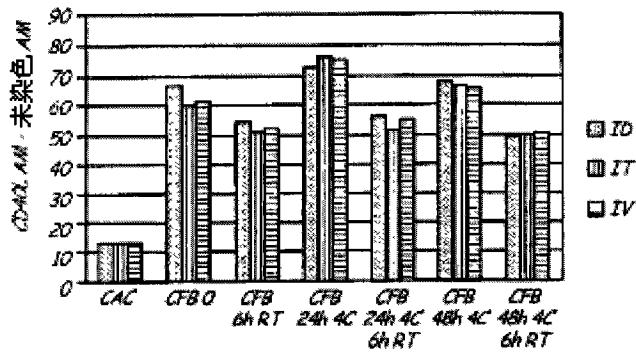


图 9C

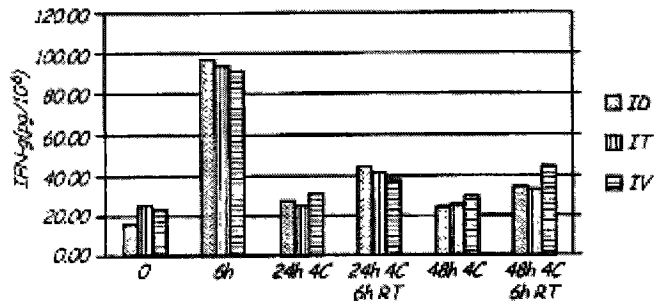


图 10A

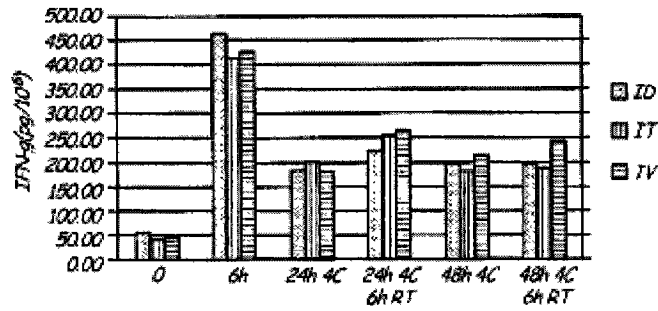


图 10B

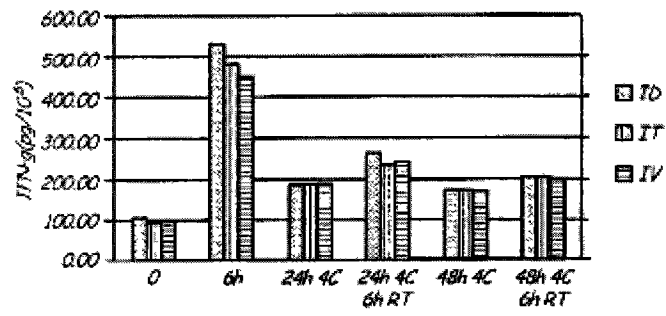


图 10C

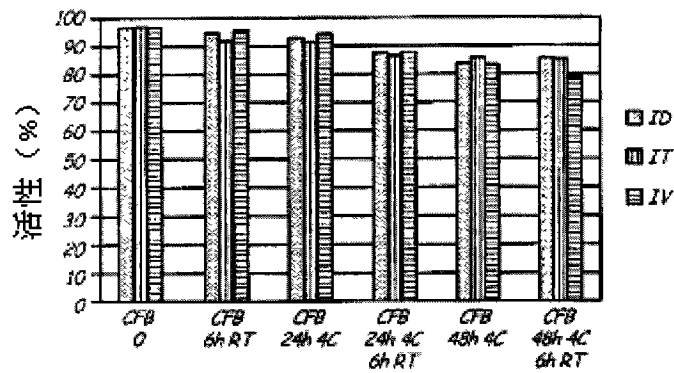


图 11A

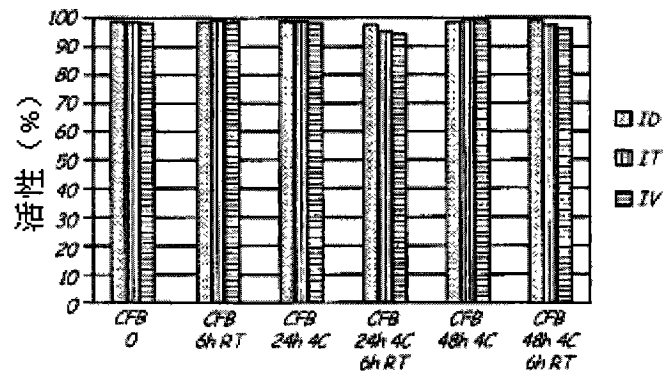


图 11B

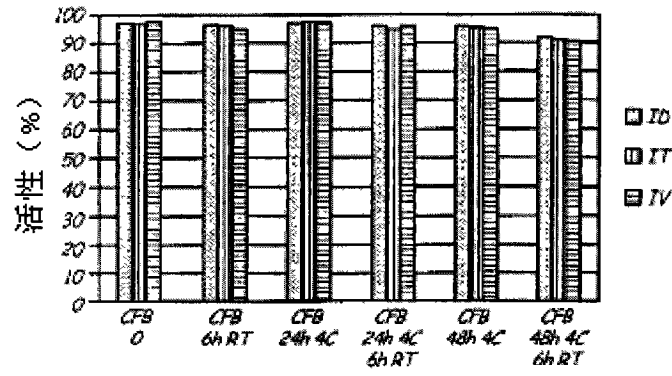


图 11C

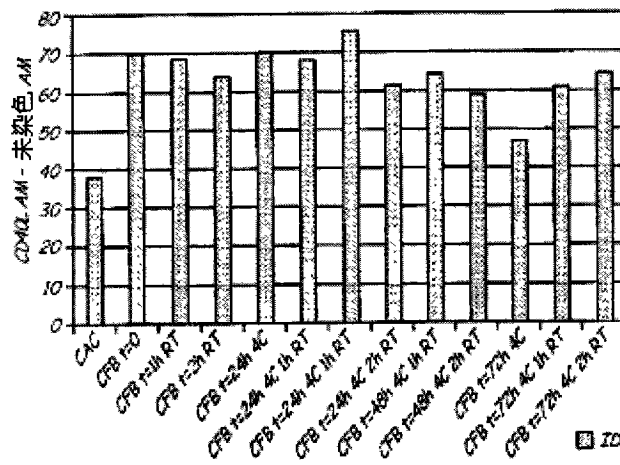


图 12A

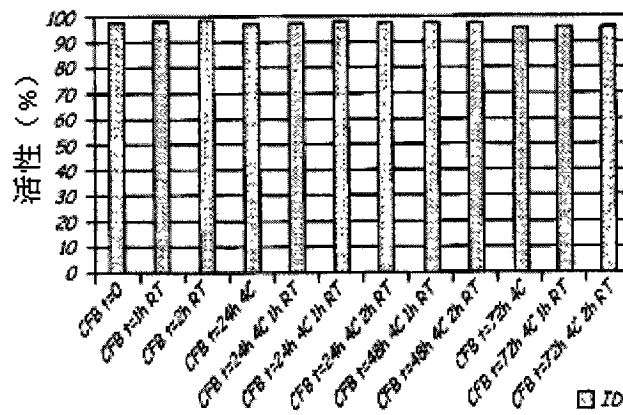


图 12B

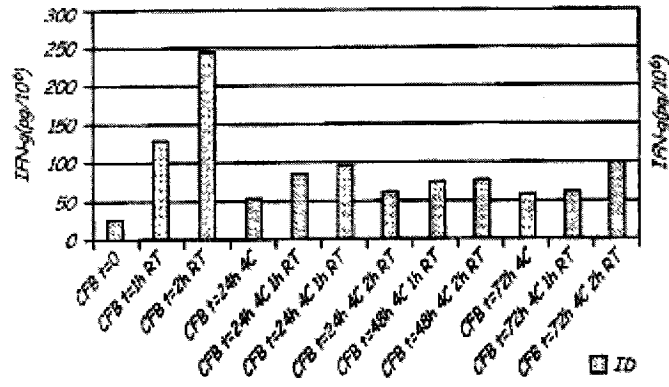


图 12C

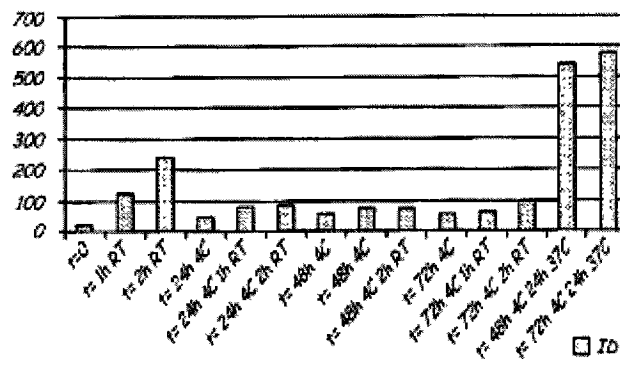


图 12D

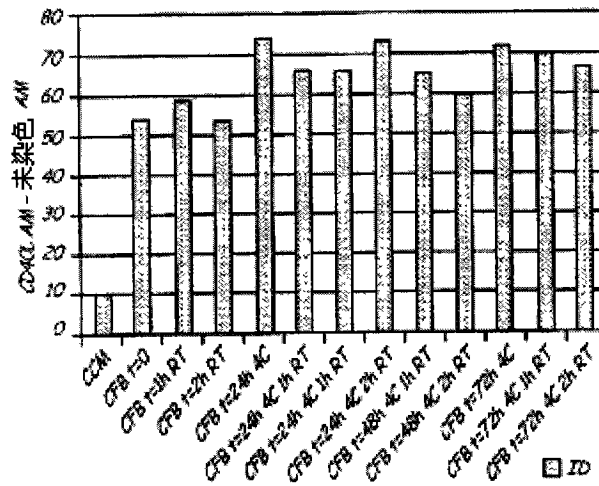


图 13A

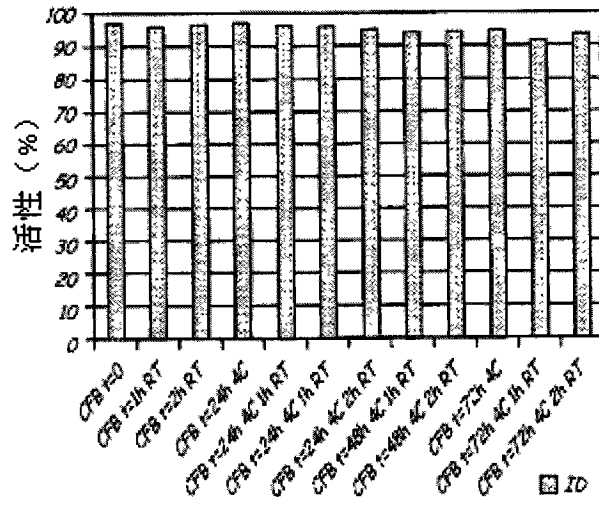


图 13B

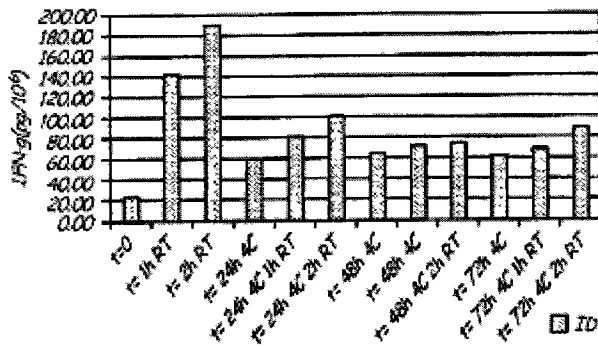


图 13C

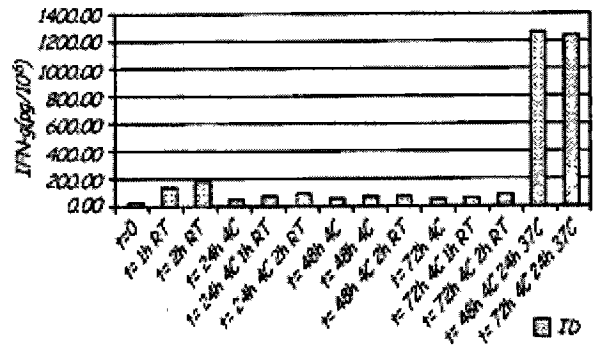


图 13D

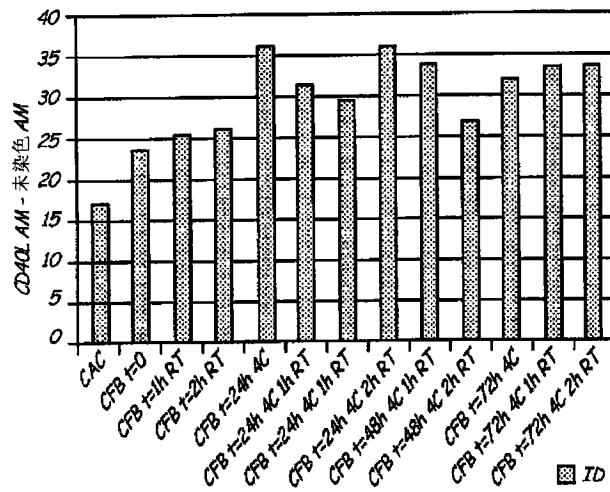


图 14A

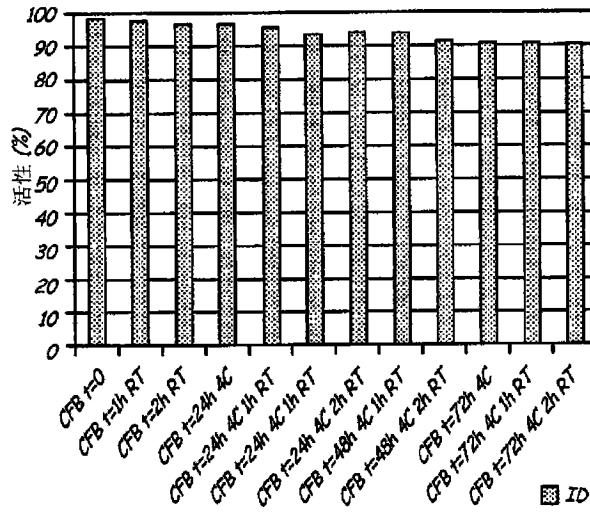


图 14B

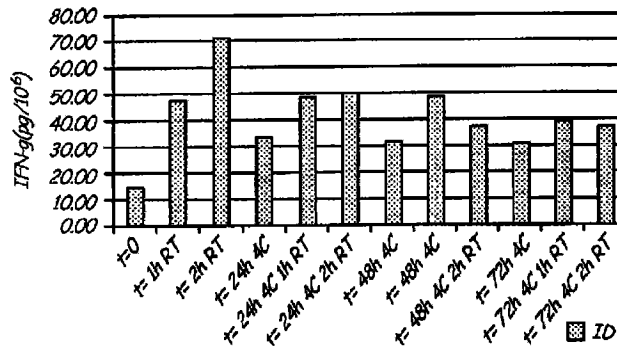


图 14C

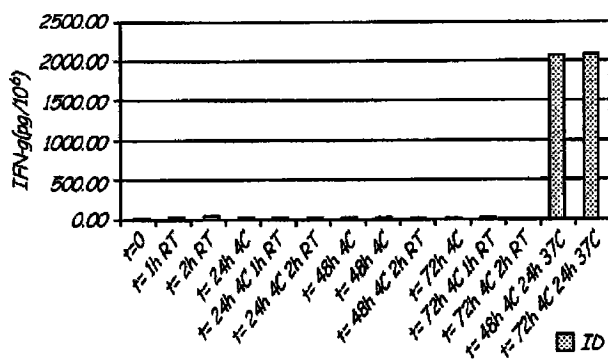


图 14D

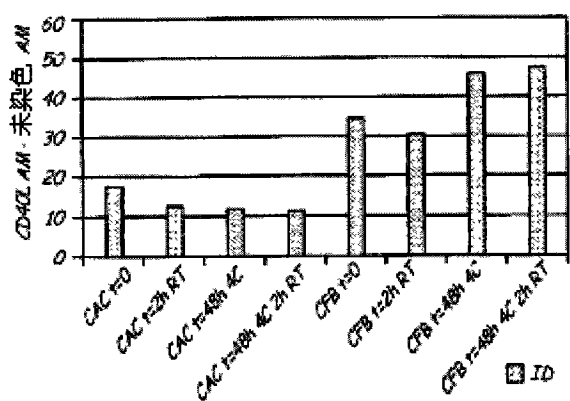


图 15A

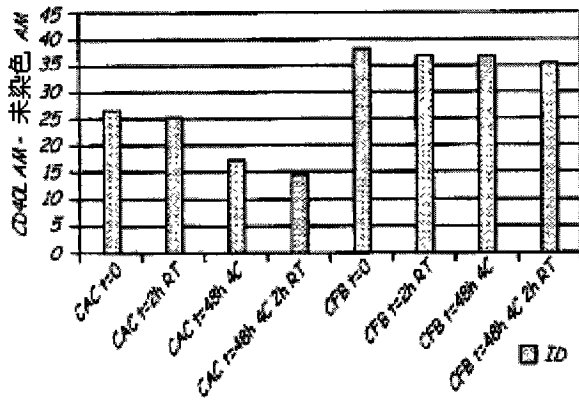


图 15B

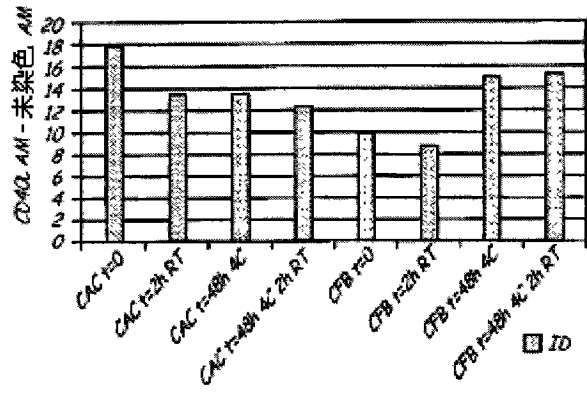


图 15C

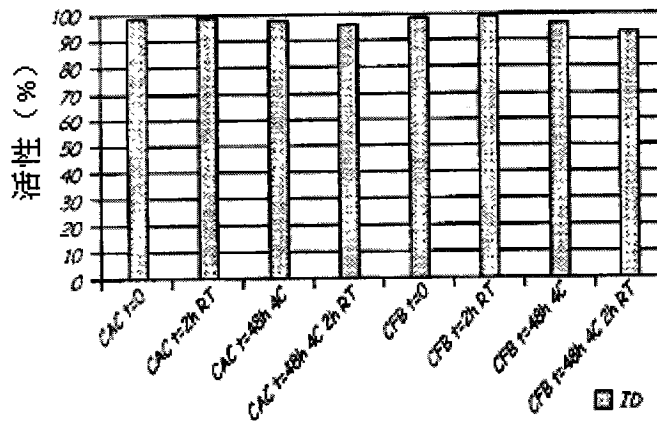


图 16A

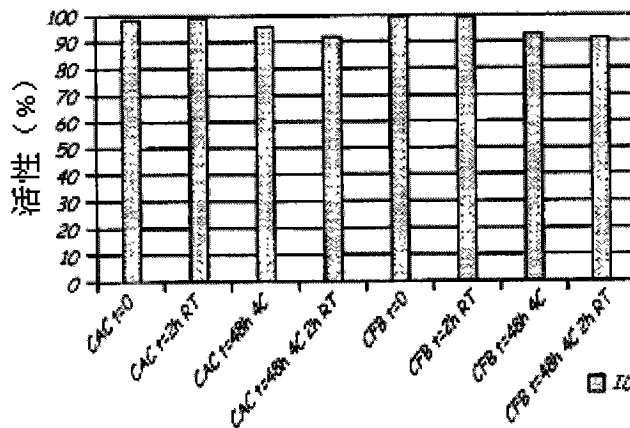


图 16B

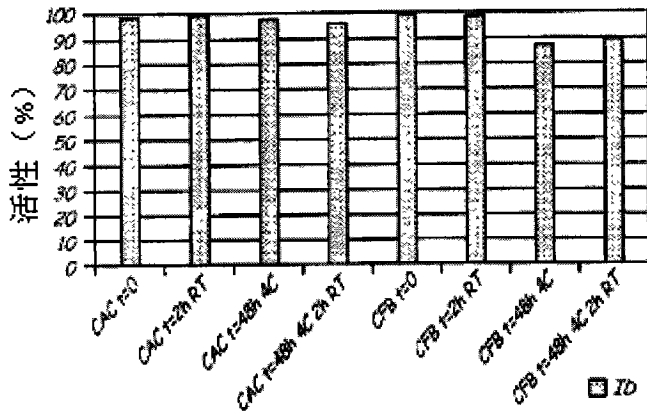


图 16C

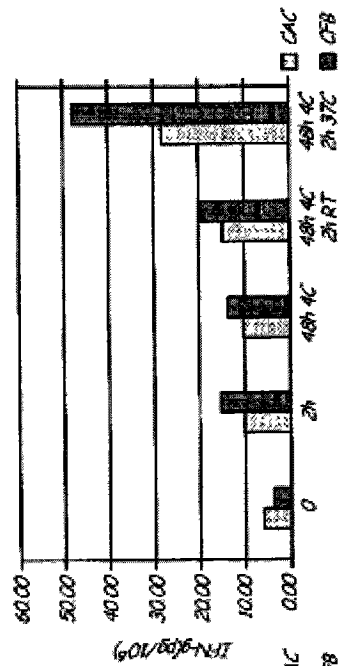


图 17B

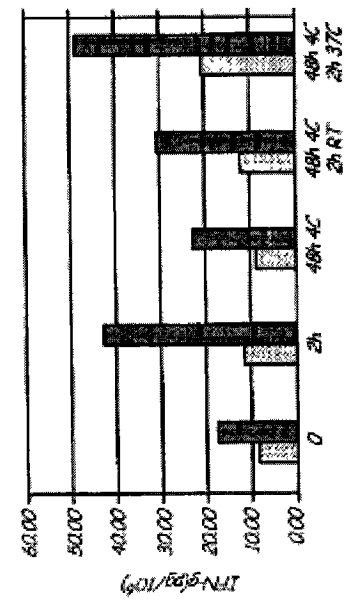


图 17A

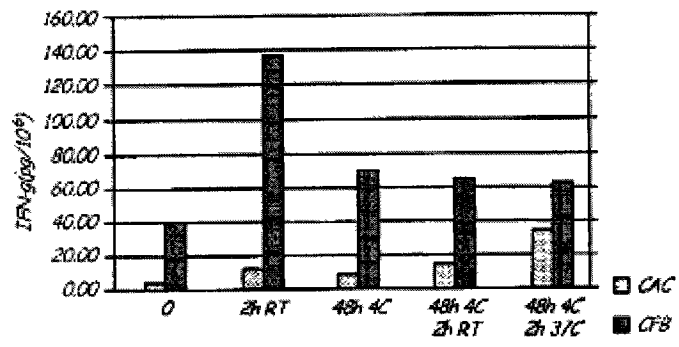


图 17C

专利名称(译)	用于加工含有活细胞的生物药物的方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN103732247A</a>	公开(公告)日	2014-04-16
申请号	CN201280032760.X	申请日	2012-05-02
[标]申请(专利权)人(译)	免疫创新治疗有限公司		
申请(专利权)人(译)	免疫创新治疗有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	免疫创新治疗有限公司		
[标]发明人	迈克尔哈诺伊		
发明人	迈克尔·哈-诺伊		
IPC分类号	A61K39/00 A61K38/17 G01N33/53 A61P35/00 A61P37/00 A61K35/17		
CPC分类号	A61K38/217 B65B1/04 A61K35/17 A61P35/00 A61P37/00 A61P37/02 A61P43/00		
代理人(译)	李志东		
优先权	61/481991 2011-05-03 US 61/528493 2011-08-29 US 61/565225 2011-11-30 US 61/582878 2012-01-04 US		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

### 摘要(译)

本发明包括用于加工在无营养的缓冲液中的活细胞组合物的方法。在所述组合物中的所述细胞被储存在无营养的培养基超过约72小时后维持其特性和功能性特征。所述储存方法使得所述细胞可以在加工设施处生产并被运送到医疗点现场。本发明还包括组合物，所述组合物在储存温度下被储存于无营养的缓冲液中的同时维持所述功能性特征。

制剂编号	细胞类型/时间	细胞活性	CD40L:AM CFB-CAC	IFN $\gamma$ (pg/10 <sup>6</sup> 个细胞)	内毒素 (EU/ml)	革兰氏染色	无菌	合格/不合格
HTC300 T7-74+72	CAC	97.95%						
	CFB 基线	90.91%	143.60	8,027	<0.2	合格	合格	
	于 cRPMI 中在 37 摄氏度下 24 小时后			45,741				合格
	4 摄氏度下 72 小时后	90.24%	192.02		<0.277	合格		
	于 cRPMI 中在 37 摄氏度下 24 小时后			28,955				
HTC300 T7-73+74	CAC	99.40%						
	CFB 基线	98.23%	117.64	6,215	<0.219	合格	合格	
	于 cRPMI 中在 37 摄氏度下 24 小时后			31,155				合格
	4 摄氏度下 72 小时后	95.65%	166.32		<0.208	合格		
	于 cRPMI 中在 37 摄氏度下 24 小时后			13,284				
HTC300 T7-77+78	CAC	98.45%						
	CFB 基线	97.61%	165.39	8,960	<0.208	合格	合格	
	于 cRPMI 中在 37 摄氏度下 24 小时后			42,520				合格
	4 摄氏度下 72 小时后	92.81%	231.50		<0.2	Pass		
	于 cRPMI 中在 37 摄氏度下 24 小时后			22,583				