

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 201992155 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2020.03.16

(51) Int. Cl. A01N 1/02 (2006.01)
A61K 35/17 (2015.01)

(22) Дата подачи заявки
2018.03.14

(54) СПОСОБЫ КРИОГЕННОГО ХРАНЕНИЯ

(31) 62/471,343

(32) 2017.03.14

(33) US

(86) PCT/US2018/022522

(87) WO 2018/170188 2018.09.20

(88) 2018.10.25

(71) Заявитель:
ДЖУНО ТЕРАПЬЮТИКС, ИНК.;
ЧЁРЧ САРА ЭЛИЗАБЕТ; ГАНТЕР
ДЖОН ЧАРЛЬЗ; ПОЛЛОК КАТРИН
(US)

(72) Изобретатель:
Чёрч Сара Элизабет, Гантер Джон
Чарльз, Поллок Катрин (US)

(74) Представитель:
Фелицына С.Б. (RU)

(57) Настоящее раскрытие относится к способам, композициям и изделиям, связанным с криогенным хранением, таким как криогенное замораживание и хранение клеток из донорской крови, и способам обработки образца афереза.

A1

201992155

201992155

A1

СПОСОБЫ КРИОГЕННОГО ХРАНЕНИЯ

Информация о родственных заявках

Данная заявка заявляет приоритет по предварительной заявке на патент США № 62/471343, поданной 14 марта 2017 года, все содержание которой включено в настоящий документ ссылкой.

Сущность изобретения

Клеточная терапия - это метод, при котором клетки вводят реципиенту для достижения терапевтической цели. Для любого конкретного реципиента введенные клетки могут происходить от другого человека или от самого реципиента. Последний случай можно назвать аутологичной клеточной терапией, то есть введением клеток обратно реципиенту, у которого были собраны клетки. Преимущества аутологичной клеточной терапии могут включать меньшую вероятность того, что организм реципиента откажется от введенных клеток, поскольку донор, у которого были собраны клетки, является реципиентом.

Что касается клеточной терапии, то как и когда клетки собираются у донора и как клетки обрабатываются после сбора и перед введением, может повлиять на эффективность и доступность терапии, например, то, как быстро клетки могут быть введены реципиенту, когда это необходимо.

С этой целью предлагаются способы, системы и композиции, и изделия для криогенного хранения клеток и клеточных композиций и/или их конструирования и/или введения объектам, таким как реципиенты. К числу преимуществ воплощений в некоторых аспектах относятся, среди прочего, повышение доступности, эффективности и/или других аспектов клеточной терапии. Способы могут также или альтернативно обеспечивать преимущества для других медицинских или исследовательских процессов, в которых используются клетки, собранные у донора.

В некоторых аспектах настоящее раскрытие относится к способам криогенного хранения, обработки, конструирования и введения клеток, а также к соответствующим изделиям, композициям и системам, включающим аферез, проведенный до того, как пациенту потребуется клеточная терапия, и криоконсервированных для последующего применения.

В некоторых аспектах клетки и композиции и изделия по настоящему изобретению представляют собой клетки, которые можно использовать, например, для последующего терапевтического лечения заболевания или состояния, такого как у донора и/или другого

реципиента. В некоторых воплощениях способы включают криогенное хранение клеток из донорской крови. Клетки, хранящиеся в криогенном состоянии, в некоторых воплощениях могут затем использоваться для клеточной терапии для лечения заболевания или состояния.

В некоторых воплощениях клетки собирают после того, как у донора диагностировано заболевание или состояние, и до того, как донор получил одно или несколько из следующего: любое начальное лечение заболевания или состояния, любое целевое лечение или любое лечение, помеченное для лечения заболевания или состояния, или любое лечение, кроме лучевой терапии и/или химиотерапии. В некоторых воплощениях клетки собирают после первого рецидива заболевания после начального лечения заболевания и до того, как донор или объект получает последующее лечение заболевания. Начальное и/или последующее лечение может быть, в соответствии с некоторыми воплощениями, терапией, отличной от клеточной терапии. В некоторых воплощениях собранные клетки могут быть использованы в клеточной терапии после первоначального и/или последующего лечения.

В некоторых воплощениях клетки собирают после второго рецидива заболевания после второй линии лечения заболевания и до того, как донор или объект получает последующее лечение заболевания. В некоторых воплощениях пациенты идентифицированы как имеющие вероятность рецидива после второй линии лечения, например, путем оценки определенных факторов риска. В некоторых воплощениях факторы риска основаны на типе заболевания и/или генетике, такой как двойная лимфома, первичное рефрактерное онкологическое заболевание или активированная В-клеточная лимфома. В некоторых воплощениях факторы риска основаны на клинических проявлениях, таких как ранний рецидив после лечения первой линии или другие плохие прогностические показатели после лечения (например, $IPI > 2$).

В некоторых воплощениях клетки собирают до того, как у донора или объекта диагностируют заболевание. В некоторых аспектах донор или объект может быть определен как подверженный риску развития заболевания, или может выбрать внесение в банк или хранение клеток, не считаясь подверженным риску развития заболевания или иметь диагноз заболевания в случае, если клеточная терапия требуется на более поздней стадии жизни. В некоторых воплощениях донор или объект могут считаться подверженными риску развития заболевания на основании таких факторов, как генетические мутации, генетические аномалии, генетические нарушения, семейный анамнез, аномалии белка (такие как дефекты при продуцировании и/или процессировании белка), и выбор образа жизни, который может увеличить риск развития заболевания. В

некоторых воплощениях клетки собирают в качестве профилактического средства.

В некоторых воплощениях клетки хранятся или хранятся в течение периода времени, превышающего или равного 12 часам, 24 часам, 36 часам или 48 часам. В некоторых воплощениях клетки хранятся или вносятся в банк в течение периода времени, превышающего или равного 1 неделе, 2 неделям, 3 неделям или 4 неделям. В некоторых воплощениях клетки помещаются в долговременное хранилище или долговременное банкирование. В некоторых аспектах клетки хранятся в течение периода времени, большего или равного 1 месяцу, 2 месяцам, 3 месяцам, 4 месяцам, 5 месяцам, 6 месяцам, 7 месяцам, 8 месяцам, 9 месяцам, 10 месяцам, 11 месяцам, 1 году, 2 годам, 3 годам, 4 годам, 5 годам, 6 годам, 7 годам, 8 годам, 9 годам, 10 годам, 11 годам, 12 годам, 13 годам, 14 годам, 15 годам, 16 годам, 17 годам, 18 годам, 19 годам, 20 годам, 25 годам, 30 годам, 35 годам, 40 годам или более.

Раскрытие также относится в некоторых аспектах к способам обработки образца афереза. В некоторых воплощениях способы включают доставку в охлажденную среду в хранилище образца афереза, взятого у донора, и криогенное хранение образца афереза в хранилище. В некоторых воплощениях перед отправкой образец обрабатывается, например, путем отбора Т-клеток, таких как CD4⁺ и/или CD8⁺ Т-клеток. В некоторых воплощениях такая обработка выполняется после доставки и перед криогенным хранением образца. В некоторых воплощениях обработка выполняется после оттаивания образца после криогенного хранения.

В некоторых воплощениях преимущество способов в соответствии с описанными воплощениями включает улучшенную эффективность и/или результативность клеточной терапии. Позволяя донорам хранить свои клетки на стадии, когда доноры и, следовательно, их клетки не подвергались обширному лечению заболевания и/или до заражения болезнью или состоянием, или до их диагностики, такие клетки могут иметь определенные преимущества для применения в клеточной терапии по сравнению с клетками, собранными после одного или после нескольких раундов лечения. Например, клетки, собранные перед одним или несколькими циклами лечения, могут быть более здоровыми, могут демонстрировать более высокие уровни определенных клеточных активностей, могут расти быстрее и/или могут быть более восприимчивыми к генетическим манипуляциям, чем клетки, которые прошли несколько раундов обработки. Другой пример преимущества согласно воплощениям, описанным в данном документе, может включать удобство. Например, благодаря сбору, необязательной обработке и хранению донорских клеток до того, как они понадобятся для клеточной терапии, эти клетки были бы легко доступны, если и когда они позже понадобятся реципиенту. Это

может увеличить возможности лаборатории афереза, предоставляя техническим специалистам большую гибкость для планирования процесса сбора афереза.

В некоторых воплощениях клетки и/или композиции и/или изделия, такие как контейнеры (например, флаконы с клетками или пакеты), содержащие клетки, маркируются одним или несколькими кодами или другими идентификаторами, например, для каталогизации клеток и образцов во время обработки, криоконсервации и/или хранения, например, при длительном хранении. В некоторых воплощениях системы и изделия включают множество контейнеров, каждый из которых содержит криоконсервированную клеточную композицию, такую как созданная в соответствии с воплощениями предоставленных способов, где каждый из множества контейнеров содержит криоконсервированные образцы, полученные от другого донора. В некоторых воплощениях контейнеры маркируются одним или несколькими идентификаторами, такими как штрих-код, метка радиочастотной идентификации (RFID) или другой идентификатор, соответствующий или указывающий на идентичность одного или нескольких из числа: донора, образца, композиции, флакона, контейнера, состояния, заболевания, пункта сбора, больницы и/или реципиента. В некоторых аспектах дополнительная информация, включенная в контейнеры или прикрепленная к ним, включает информацию, касающуюся даты сбора афереза и/или криоконсервации и/или даты истечения срока годности и/или местоположения в банке или хранилище. В некоторых воплощениях код соответствует коду, появляющемуся на браслете, удостоверяющем личность пациента, или в больничной, медицинской системе или документации или в системе или документации учреждения для сбора, такого как донорное или ассоциированное учреждение.

Подходящие способы или системы кодирования или маркировки включают, без ограничения указанным, кодирование с использованием меток в печатном, магнитном или электронном виде, которые могут считываться световыми, электронными или магнитными средствами, такими как штрих-коды, QR-коды, RFID или транспондеры, такие как активируемые светом микро-транспондеры, недорогие кремниевые устройства, которые хранят уникальный 30-битный идентификационный код только для чтения и излучают код в виде радиочастотного сигнала при питании и опросе со светоизлучающим устройством считывания. В некоторых воплощениях все обрабатываемые компоненты (пробирка для сбора образцов, компоненты для очистки клеток, компоненты для культивирования и размножения клеток и т.д.) предварительно регистрируются в реестре компонентов учреждения, где регистрируются функции каждого компонента и предполагаемая стадия применения в технологическом процессе обработки

регистрируется относительно уникального идентифицирующего кода компонента. В некоторых воплощениях используется транспондер, а в некоторых аспектах относится к любому способу или изделию для кодирования идентичности уникального образца, которая может быть прочитана.

В некоторых воплощениях на различных стадиях, например, на каждой стадии в способах, например, в технологическом процессе обработки и/или до или при введении реципиенту, один или более идентифицирующих кодов считываются в запись, такую как уникальная запись конкретного пациента в центральной базе данных, и/или используются для подтверждения личности образца и/или пациента, от которого он был получен или которому должен быть введен, и/или другой информации об образце и/или его сборе или обработке, и/или для подтверждения правильного непрерывного документального учёта.

Подробное описание

Следующее подробное описание и примеры иллюстрируют определенные воплощения настоящего раскрытия. Специалистам в данной области техники должно быть понятно, что существует множество вариаций и модификаций этого раскрытия, которые охватываются его объемом. Соответственно, описание некоторых воплощений не должно рассматриваться как ограничение.

Используемый в данном документе термин «криогенно хранить» или «криогенное хранение», как правило, относится к хранению образца, например, образца, содержащего клетки, при температуре от -210°C до -80°C и в условиях, при которых клетки способны оттаивать после периода такого хранения, например, при или после оттаивания, по меньшей мере, части или существенной части клеток в образце остаются жизнеспособными и/или сохраняют, по меньшей мере, часть их биологической функции. В одном аспекте образец клеток способен оттаивать так, чтобы, по меньшей мере, определенный процент составлял, например, около или более или превышал 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90 % или 100% клеток в образце остаются жизнеспособными и/или отрицательными в отношении апоптотического маркера или его индикатора, такого как расщепленная каспаза и/или окрашивание аннексином V.

Используемый в данном документе термин криогенное замораживание означает понижение температуры образца, например, образца, содержащего клетки, до температуры от -210 до -80°C .

В некоторых воплощениях термин обогащать или обогащение, используемый в данном документе в контексте образца, содержащего клетки, означает отделение, отбор или очистку типа или типов клеток из образца, что приводит к получению более высокой концентрации типа или типов клеток. Термин «обогащать» необязательно, но может в

некоторых воплощениях включать достижение абсолютной или почти абсолютной чистоты клеток.

Используемый в данном документе объект или донор представляет собой млекопитающее, такое как человек или другое животное, и обычно представляет собой человека. В некоторых воплощениях объект, например, пациент, которому вводят клетки, клеточные популяции или композиции, является млекопитающим, обычно приматом, таким как человек. В некоторых воплощениях примат представляет собой обезьяну или человекообразную обезьяну. Объект может быть мужчиной или женщиной и может быть любого подходящего возраста, включая младенцев, детей, подростков, взрослых и/или пожилых людей. В некоторых воплощениях объект является млекопитающим, не являющимся приматом, таким как грызун.

В некоторых воплощениях термин «среда для замораживания» означает раствор, который в сочетании с образцом, содержащим клетки, например, образцом афереза, способствует сохранению одной или нескольких биологических функций клеток во время процесса охлаждения, криогенного замораживания, и/или криогенного хранения образца или клеток. В некоторых воплощениях термины среда для замораживания и криогенная среда являются взаимозаменяемыми.

В некоторых воплощениях термин «посткриогенно модифицирующий» или «посткриогенная модификация», при использовании в данном документе в контексте хранящегося в криогенных условиях образца, содержащего клетки, означает процесс, применяемый к образцу после оттаивания клеток.

В некоторых воплощениях термин «рецидив», используемый в данном документе, обычно означает возвращение признаков или симптомов заболевания после периода улучшения.

Аферез обычно относится к процессу сбора крови донора или объекта. Процесс может включать процесс сбора клеток из донорской крови. Лейкаферез используется для обозначения такого процесса, который собирает лейкоциты из крови донора. В некоторых воплощениях предоставленные воплощения и композиции относятся к сбору, например, посредством афереза, образцов крови от донора; в некоторых воплощениях способы и композиции относятся к введению композиций, таких как композиции для клеточной терапии, реципиенту. В некоторых воплощениях донор и получатель являются одним и тем же лицом. В некоторых воплощениях клетки донора вводят реципиенту, который является другим объектом.

В некоторых воплощениях способы включают криогенное хранение клеток из донорской крови. В некоторых воплощениях клетки, хранящиеся в криогенном состоянии,

впоследствии вводят реципиенту для лечения заболевания. Например, как описано в публикациях патентной заявки США №№ 2016/0158359 и 2016/0206656 и публикации РСТ № WO 2016/064929 и WO 2016/033570, полностью включенных в настоящий документ, клетки могут использоваться как часть обработки клеточной терапией, такой как Т-клеточная терапия.

В некоторых воплощениях донором является объект, например, человек, который позднее получает собранные клетки, т.е. реципиент. В таких воплощениях терапия называется аутологичной клеточной терапией. Как обсуждено в данном документе, преимущества аутологичной клеточной терапии могут включать уменьшенную вероятность того, что организм реципиента отклонит введенные клетки, поскольку донор, у которого собраны клетки, является реципиентом. В некоторых воплощениях донором и получателем являются разные люди. В таких воплощениях терапия может быть названа аллогенной клеточной терапией. Преимущества аллогенной терапии могут включать единообразие и согласованность между образцами клеток. Другие преимущества могут включать, в некоторых аспектах, более высокую доступность клеток по сравнению с аутологичной клеточной терапией, например, в условиях, когда донорские клетки доступны в то время, когда клетки от реципиента могут отсутствовать, например, когда реципиент не может предоставить такие клетки и/или не способен подвергаться аферезу, например, когда реципиент слишком болен.

В некоторых воплощениях клетки собирают путем афереза, например, любым из ряда известных способов афереза. Типичные способы сбора афереза включают взятие крови у донора с использованием общепринятых практик, выполняемых медицинским работником. Медицинский работник может, например, выбрать участок тела донора, обычно руку, стерилизовать участок, выполнить флеботомию и взять кровь в контейнер, подходящий для хранения крови, такой как стерильный пакет для крови, содержащий антикоагулянты. Например, медицинский работник может выполнять практические методики, изложенные во Всемирной организации здравоохранения («ВОЗ»), *WHO guidelines on drawing blood: best practices in phlebotomy* (2010 г.). Специалист может быть, а может и не быть профессионалом, который диагностирует заболевание у донора, как описано ниже. После сбора крови компоненты крови, такие как плазма и различные клетки крови, могут быть отделены путем центрифугирования.

В некоторых воплощениях клетки собирают после того, как у донора диагностировано заболевание, и до того, как донор получает какое-либо лечение от этого заболевания и/или до того, как донор получает целевое лечение, например, лечение, специфически распознающее антиген или связывающее его с антигеном, или другой

лиганд, связанный с заболеванием или состоянием. В некоторых воплощениях клетки собирают за некоторое время до того, как донору был поставлен диагноз заболевания или состояния. Преимущества таких воплощений могут включать улучшенную жизнеспособность клеток, активность и восприимчивость к генетическим манипуляциям по сравнению с клетками, которые собираются после того, как донор получил лечение от заболевания. В некоторых воплощениях клетки собирают у донора после первого рецидива заболевания после первоначального лечения заболевания и до того, как донор получает последующее лечение заболевания. Преимущества таких воплощений могут включать улучшенную жизнеспособность клеток, активность и восприимчивость к генетическим манипуляциям по сравнению с клетками, которые собирают после того, как донор получил два или более раунда лечения от заболевания. В других воплощениях клетки собирают у донора после второго рецидива заболевания и до того, как донор получает последующее лечение от заболевания.

Среди заболеваний, состояний и расстройств доноров и/или реципиентов, и/или которые доноры и/или реципиенты в настоящем документе имеют или предположительно имеют и/или являются мишенью для рекомбинантных рецепторов, представлены опухоли, включая солидные опухоли, гематологические злокачественные новообразования и меланомы, в том числе локализованные и метастатические опухоли. Также среди заболеваний, состояний и расстройств имеются инфекционные заболевания, такие как заражение вирусом или другим патогеном, например, HIV, HCV, HBV, CMV, HPV и паразитарное заболевание. Также среди заболеваний, состояний и нарушений представлены аутоиммунные и воспалительные заболевания. В некоторых воплощениях заболевание или состояние представляет собой опухоль, злокачественную опухоль, злокачественное новообразование, неоплазию или другое пролиферативное заболевание или расстройство. Такие заболевания включают, без ограничения указанным, лейкоз, лимфому, например, хронический лимфолейкоз (CLL), малый лимфоцитарный лейкоз (SLL), острый лимфобластный лейкоз (ALL), неходжкинскую лимфому, острый миелоидный лейкоз, множественную миелому, рефракторную фоллофорию, мантийноклеточную лимфому, индолентную В-клеточную лимфому, В-клеточные злокачественные новообразования, рак толстой кишки, легкого, печени, молочной железы, предстательной железы, яичника, рак кожи, меланому, рак кости и рак мозга, рак яичников, карциному, почечно-клеточный рак, панкреатические аденокарциномы, лимфому Ходжкина, рак шейки матки, колоректальный рак, глиобластому, нейробластому, саркому Юинга, медуллобластому, остеосаркому, синовиальную саркому и/или мезотелиому. В некоторых воплощениях заболевание или состояние представляет собой DLBCL, если не указано

инное (NOS; включает трансформированный DLBCL из фолликулярной лимфомы), В-клеточную лимфому высокого уровня с перестройками MYC и BCL2 и/или BCL6 с гистологией DLBCL.

В некоторых воплощениях объект демонстрирует CLL с показанием к лечению на основании рекомендаций iwCLL и клинически поддающегося измерению заболевания, или SLL, который является доказанным при биопсии SLL. В некоторых аспектах объекты получали и не получали лечение ингибитором тирозинкиназы Брутона (BTKi) или считались неподходящими для терапии BTKi.

В некоторых воплощениях объекты с CLL или SLL и признаками высокого риска, например, имеющими сложные цитогенетические аномалии (3 или более хромосомных аномалий), делецию 17p, мутацию TP53 или немутантную вариабельную область тяжелой цепи иммуноглобулина (IGHV), потерпели неудачу, по меньшей мере, 2 линии предшествующей терапии, включая BTKi. В некоторых воплощениях объекты с CLL или SLL и признаками стандартного риска не прошли, по меньшей мере, 3 линии предшествующей терапии, включая BTKi. В некоторых воплощениях объекты с CLL или SLL, которые не переносят BTKi и не получали, по меньшей мере, 6 месяцев терапии BTKi или не соответствуют требованиям для BTKi, потерпели неудачу, по меньшей мере, 1 (высокий риск) или 2 (стандартный риск) линии не-BTKi терапии.

В некоторых воплощениях объект не подходит для одного или нескольких клинических испытаний и/или разрешенных сконструированных клеточных иммунотерапий. В некоторых воплощениях объект еще не подходит для одного или нескольких клинических испытаний и/или утвержденных инженерно-клеточных иммунотерапевтических процедур, но рискует стать или может стать приемлемым. В некоторых воплощениях объект не подходит для одного или нескольких клинических испытаний и/или утвержденных инженерных клеточных иммунотерапий из-за ожидаемого или фактического ответа на одну или несколько предыдущих линий терапии или после ауто-HSCT. В некоторых воплощениях объект не подходит для одного или нескольких клинических испытаний и/или разрешенных сконструированных клеточных иммунотерапий, если они не рецидивировали и/или не являются резистентными к одной или нескольким линиям предыдущей терапии (например, двум или более, трем или более, или четыре или более строк предыдущей терапии) или после ауто-HSCT. В некоторых воплощениях объект не подходит для одного или нескольких клинических испытаний и/или одобренных инженерных клеточных иммунотерапий из-за отсутствия цитогенетических факторов высокого риска.

В некоторых аспектах объект имеет большое количество метастазов и/или широко

распространенную локализацию метастазов. В некоторых аспектах опухолевая нагрузка у объекта является низкой, и у объекта имеется мало метастазов. В некоторых воплощениях размер или сроки введения доз определяются исходным бременем заболевания у объекта. Например, в то время как в некоторых аспектах объекту можно вводить относительно низкое количество клеток в первой дозе, в контексте более низкого бремени болезни доза может быть выше.

В некоторых воплощениях заболевание или состояние представляет собой инфекционное заболевание или состояние, такое как, без ограничения указанным, вирусные, ретровирусные, бактериальные и протозойные инфекции, цитомегаловирус (CMV), вирус Эпштейна-Барра (EBV), аденовирус, полиомавирус ВК и т.д.

В некоторых воплощениях заболевание или состояние представляет собой аутоиммунное или воспалительное заболевание или состояние, такое как артрит, например, ревматоидный артрит (RA), диабет I типа, системную красную волчанку (SLE), воспалительное заболевание кишечника, псориаз, склеродермию, аутоиммунное заболевание щитовидной железы, болезнь Грейвса, болезнь Крона, рассеянный склероз, астму, иммунодефицит и/или заболевание или состояние, связанное с трансплантацией.

В некоторых воплощениях заболевание или состояние представляет собой заболевание трансплантат против хозяина (GVHD), такое как GVHD у объекта, который подвергается или перенес трансплантацию, такую как трансплантация аллогенного органа и/или трансплантация костного мозга и/или гемопоэтических стволовых клеток. Добавление нативных выделенных $CD4^+CD25^+$ Т-клеток, таких как *in vitro*-размноженные Трег-клетки, может задерживать и/или предотвращать заболевание трансплантат против хозяина в некоторых контекстах. В некоторых воплощениях предоставленные композиции и способы Трег предотвращают и/или уменьшают риск GVHD или его симптомов или признаков. В некоторых воплощениях заболевание или состояние представляет собой отторжение трансплантата органа или его риск, такой как трансплантат сердца, печени, роговицы, почки, легкого, поджелудочной железы или другого органа.

В некоторых воплощениях аутоиммунное или воспалительное заболевание представляет собой хроническое и/или острое воспалительное заболевание. В некоторых аспектах заболевание или расстройство представляет собой или включает системную красную волчанку (SLE), ревматоидный артрит (RA), полимиозит, рассеянный склероз (MS), диабет, воспалительное заболевание кишечника (IBD), сахарный диабет I типа или аутоиммунный инсулит, аутоиммунный тиреоидит, аутоиммунный увеит или увеоретинит, аутоиммунный орхит, аутоиммунный оофорит, псориаз, витилиго, аутоиммунный простатит, любой нежелательный иммунный ответ или другое

воспалительное или аутоиммунное заболевание или состояние, такое как состояние, характеризующееся нежелательным иммунным ответом и/или индуцированной вирусами иммунопатологией. В некоторых аспектах антиген, например, антиген, специфически связанный с Т-клеткой и/или рекомбинантным рецептором, представляет собой собственный или аутоантиген, такой как человеческий антиген, экспрессированный на нормальной или незараженной ткани. В некоторых аспектах антиген не является антигеном, экспрессируемым в злокачественной опухоли или не экспрессируемым в злокачественной опухоли у объекта. В некоторых аспектах объект не имеет и/или не подозревается на наличие онкологического заболевания.

В некоторых воплощениях антиген, распознаваемый клеткой, химерный антигенный рецептор (CAR) или Т-клеточный рецептор (TCR) или другой рекомбинантный рецептор, представляет собой или содержит аутоантиген или антиген, который перекрестно реагирует с аутоантигеном, таким как патогенный антиген, вовлеченный в патофизиологию аутоиммунного заболевания. В некоторых воплощениях, например, когда заболевание или состояние представляет собой воспалительное заболевание кишечника (IBD), антиген представляет собой антиген, который экспрессируется в больной толстой кишке или подвздошной кишке. В некоторых воплощениях, например, в контексте RA, антиген или лиганд является эпитопом коллагена или антигена, присутствующего в суставах. В некоторых воплощениях, таких как лечение или профилактика сахарного диабета I типа или аутоиммунного инсулита, антиген представляет собой антиген β -клеток поджелудочной железы. В некоторых воплощениях, таких как MS, антиген представляет собой антиген миелинового основного белка, MOG-1, MOG-2 или другой нейрональный антиген. В некоторых воплощениях, например, когда заболевание или состояние представляет собой аутоиммунный тиреоидит, антиген или лиганд является антигеном щитовидной железы. В некоторых воплощениях, например, когда заболевание или состояние представляет собой аутоиммунный гастрит, антиген представляет собой желудочный антиген. В некоторых воплощениях, таких как лечение аутоиммунного увеита или увеоретинита, антиген представляет собой S-антиген или другой увеальный или ретинальный антиген. В некоторых воплощениях, например, когда заболевание или состояние представляет собой орхит, антиген представляет собой антиген яичка. В некоторых воплощениях, таких как лечение или профилактика аутоиммунного оофорита, антиген представляет собой яичниковый антиген. В некоторых воплощениях, например, для лечения или профилактики псориаза, антиген представляет собой антиген кератиноцитов или другой дермальный или эпидермальный антиген. В некоторых воплощениях, например, для

лечения или профилактики витилиго, антиген представляет собой антиген меланоцитов. В некоторых воплощениях, например, для лечения или профилактики аутоиммунного простатита, антиген представляет собой антиген простаты. В некоторых воплощениях антиген может включать активационный антиген, экспрессируемый на эффекторных Т-клетках, присутствующих в участке нежелательного иммунного ответа.

В некоторых воплощениях антиген представляет собой цитруллинированный виментин.

В некоторых воплощениях, например, когда заболевание или состояние представляет собой отторжение ткани или органа или включает его, антиген может включать молекулу МНС или ее часть, имеющую гаплотип трансплантированной ткани.

В некоторых воплощениях антиген, связанный с заболеванием или расстройством, представляет собой GPRC5D, глиома-ассоциированный антиген, β -хорионический гонадотропин человека, альфафетопротеин (AFP), антиген созревания В-клеток (BCMA, BCM), рецептор активирующего фактора В-клеток (BAFFR, BR3), трансмембранный активатор и интерактор с CAML (TACI), Fc-рецептор-подобный 5 (FCRL5, FcRH5), рецептор орфанной тирозинкиназы ROR1, Her2, L1-CAM, CD19, CD20, CD22, мезотелин, CEA и поверхностный антиген гепатита В, антифолатный рецептор, CD23, CD24, CD30, CD33, CD38, CD44, EGFR, EGP-2, EGP-4, EphA2, ErbB2, 3 или 4, FBP, фетальный ацетилхолиновый рецептор, GD2, GD3, HMW-MAA, IL-22R-альфа, IL-13R-альфа2, kdr, легкая цепь каппа, Льюис Y, L1-клеточную адгезионную молекулу, MAGE-A1, мезотелин, MUC1, MUC16, PSCA, лиганды NKG2D, NY-ESO-1, MART-1, gp100, онкофетальный антиген, ROR1, TAG72, VEGF-R2, карциноэмбриональный антиген (CEA), простат-специфический антиген, PSMA, Her2/neu, рецептор эстрогена, рецептор прогестерона, эфрин B2, CD123, CS-1, c-Met, GD-2 и MAGE A3, CE7, опухоль Вилмса 1 (WT-1), циклин, такой как циклин A1 (CCNA1), и/или биотинилированные молекулы, и/или молекулы, экспрессируемые HIV, HCV, HBV или другим патогеном.

В некоторых воплощениях заболевание представляет собой онкологическое заболевание. Например, как описано в публикациях патентных заявок США № 2016/0158359 и 2016/0206656 и публикации патентных заявок PCT № WO 2016/064929, полностью включенных в настоящий документ, клетки можно использовать как часть лечения онкологического заболевания, например, как Т-клеточную терапию.

Онкологическое заболевание может быть, например, доброкачественным или злокачественным. Онкологическое заболевание может включать, например, первичную злокачественную опухоль или метастазирующую злокачественную опухоль. В некоторых воплощениях онкологическое заболевание может быть любой стадии, такой как стадия

ТХ, стадия Т0, стадия Т1, стадия Т1а, стадия Т1b, стадия Т2, стадия Т2а, стадия Т2b, стадия Т3, стадия Т3а, стадия Т3b, стадия Т4, стадия Т4а, стадия Т4b, стадия NX, стадия N0, стадия N1, стадия N1а, стадия N1b, стадия N2, стадия N2а, стадия N2b, стадия N2с, стадия N3, стадия МХ, стадия M0, стадия M1, стадия M1а, стадия M1b, стадия M1с, M2, стадия M3, стадия M3V, стадия M4, стадия M4E, стадия M5, стадия M6 или стадия M7.

В некоторых воплощения онкологическое заболевание - это острый лимфобластный лейкоз, острый миелоидный лейкоз, аденокортикальный рак, саркома Капоши, астроцитомы, базальноклеточная карцинома, рак желчного протока, рак мочевого пузыря, саркома Юинга, остеосаркома, злокачественная фиброзная гистиоцитарная гистиоцитома, рак мозга, рак молочной железы, бронхиальный рак, лимфома Беркитта, карциноидный рак, рак сердца, атипичная тератоидная или рабдоидная опухоль, эмбриональная опухоль, опухоль половых клеток, первичная лимфома центральной нервной системы, рак шейки матки, холангиокарцинома, хронический лимфоцитарный лейкоз, хронический миелогенный лейкоз, хроническое миелоидное новообразование, колоректальный рак, краниофарингиома, кожная Т-клеточная лимфома, рак эндометрия, эпендимомы, рак пищевода, эстезионейробластома, экстракраниальная опухоль половых клеток, внегонадная опухоль половых клеток, внутриглазная меланома, ретинобластома, рак маточной трубы, рак желчного пузыря, желудочно-кишечная карциноидная опухоль, желудочно-кишечные стромальные опухоли, глиобластома, овариальная опухоль половых клеток, рак яичка, гестационный трофобластическая болезнь, волосатоклеточный лейкоз, рак головы и шеи, гепатоцеллюлярный рак, лимфома Ходжкина, внутриглазная меланома, опухоль островковых клеток, нейроэндокринная опухоль поджелудочной железы, рак почки, рак легкого (немелкоклеточный и мелкоклеточный), злокачественная фиброзная гистиоцитома, карцинома из клеток Меркеля, мезотелиома, карцинома срединного тракта, рак ротовой полости, множественная эндокринная неоплазия, фунгоидный микоз, миелодиспластические или миелопролиферативные новообразования, хронический миелогенный лейкоз, острый миелоидный лейкоз, хронические миелопролиферативные неоплазии, назофарингеальный рак, нейробластома, неходжкинская лимфома, рак яичника, рак поджелудочной железы, папилломатоз, параганглиома, рак придаточных пазух и носовой полости, рак паращитовидной железы, рак полового члена, рак глотки, феохромоцитома, опухоль гипофиза, неоплазия клеток плазмы, множественная миелома, плеврорегочная бластома, перитонеальный рак, рак предстательной железы, рак прямой кишки, ретинобластома, рак слюнных желез, рабдомиосаркома, синдром Сезари, рак тонкой кишки, мелкий лимфоцитарный лейкоз, плоскоклеточная карцинома, плоскоклеточный рак шеи, рак яичка, рак горла, рак носоглотки, рак ротоглотки, рак

глотки, тимомы, рак тимуса, рак щитовидной железы, рак уретры, саркома матки, рак влагалища или опухоль Вильмса.

В некоторых воплощениях онкологическое заболевание - это хронический лимфолейкоз, лейкоз из малых лимфоцитов, острый лимфобластный лейкоз, пролимфоцитарный лейкоз, волосатоклеточный лейкоз, острый лимфолейкоз, острый лимфобластный лейкоз с нулевым фенотипом, лимфома Ходжкина, неходжкинская лимфома, диффузная крупноклеточная В - клеточная лимфома, множественная миелома, фолликулярная лимфома, лимфома селезенки, лимфома маргинальной зоны, лимфома мантийных клеток, индолентная В-клеточная лимфома или острый миелоидный лейкоз.

В некоторых воплощениях онкологическое заболевание включает клетки, экспрессирующие, по меньшей мере, один или несколько из числа рецепторов орфанной тирозинкиназы ROR1, EGFR, Her2, L1-CAM, CD19, CD20, CD22, мезотелин, CEA и поверхностного антигена гепатита В, антифолатного рецептора, CD23, CD24, CD30, CD33, CD38, CD44, EGFR, EGP-2, EGP-4, EphA2, ErbB2, 3 или 4, FBP, фетального ацетилхолинового рецептора, GD2, GD3, HMW-MAA, IL-22R-альфа, IL-13R-альфа2, kdr, легкой цепи каппа, Lewis Y, молекулы адгезии клеток L1, MAGE-A1, мезотелина, MUC1, MUC16, антигена созреваия В-клеток (BCMA), FCRL5/FCRH5, GPRC5D, PSCA, лигандов NKG2D, NY-ESO-1, MART-1, gp100, онкофетального антигена, ROR1, TAG72, VEGF-R2, карциноэмбрионального антигена (CEA), простат-специфического антигена, PSMA, Her2/neu, рецептора эстрогена, рецептора прогестерона, эфрина B2, CD123, CS-1, c-Met, GD-2 и MAGE A3, CE7, белка опухоли Вильмса 1 (WT-1), циклина, такого как циклин A1 (CCNA1), и/или биотинилированных молекул, и/или молекул, экспрессируемых HIV, HCV, HBV или другими патогенами. В некоторых воплощениях онкологическое заболевание включает клетки, экспрессирующие CD19. В некоторых воплощениях онкологическое заболевание включает клетки, экспрессирующие BCMA.

В некоторых воплощениях заболевание диагностируется медицинским работником (например, лицом, имеющим лицензию в соответствии с медицинским регулирующим органом в стране, штате, провинции, округе, муниципалитете или районе города), который осматривает донора и подтверждает наличие заболевания у донора, наблюдая нарушение структуры или функции у донора. Медицинский работник может включать, например, врача, такого как гематолог, иммунолог, онколог или практикующая медсестра.

В некоторых воплощениях диагноз исключает самодиагностику донора и/или исключает диагноз службами генетического тестирования.

В некоторых воплощениях начальное лечение и последующее лечение могут, независимо друг от друга, включать лечение онкологического заболевания, такого как

химиотерапия, лучевая терапия, иммунотерапия, гормональная терапия и/или хирургическое вмешательство. Химиотерапия может включать, например, введение, по меньшей мере, одного из числа циклофосфамида, метотрексата, 5-фторурацила, доксорубина, мустина, винкристина, прокарбазина, преднизолон, блеомицина, винбластин, дакарбазин, этопозид, цисплатин, эпирубинин, капецитабин, фолиевой кислоты, оксалиплатин и других низкомолекулярных ингибиторов киназ. Иммунотерапия может включать, например, введение, по меньшей мере, одного из антител и иммунных клеток, таких как естественные клетки-киллеры, лимфокин-активированные клетки-киллеры, цитотоксические Т-клетки и дендритные клетки. В некоторых воплощениях лечение (начальное или последующее) может включать любую или всю лучевую терапию (например, облучение 4000 сГр), спасение аутологичных стволовых клеток, трансплантацию стволовых клеток, трансплантацию костного мозга и трансплантацию гемопоэтических стволовых клеток (HSCT). В некоторых воплощениях лечение может включать CAR Т-клеточную терапию. В некоторых воплощениях лечение может включать Тисагенлеклейсел (Кимрия). В некоторых воплощениях лечение может включать Аксикабтаген силорексет (Йескарта). В некоторых воплощениях начальная и/или последующая терапия может включать любой или все из числа цитарабина (ага-С; включая высокие дозы цитарабина), даунорубинин (дауномицин), идарубинин или кладрибин (лейстатин, 2-CdA), отдельно или в комбинации. В некоторых воплощениях начальная и/или последующая терапия может включать любое или все из числа бортезомиб, карфилзомиб, талидомида, леналидомида, помалидомида и кортикостероидов, таких как преднизон и дексаметазон. В некоторых воплощениях начальная и/или последующая терапия может включать любое или все из числа алкилирующих агентов, таких как циклофосфамид, хлорамбуцил, бендамустин и ифосфамид; платиновых лекарственных средств, таких как цисплатин, карбоплатин и оксалиплатин; аналогов пурина, таких как флударабин, пентостатин и кладрибин, цитарабин; антиметаболитов, таких как гемцитабин, метотрексат и пралатрексат; и других агентов, таких как винкристин, доксорубинин, митоксантрон, этопозид и блеомицин. В некоторых воплощениях начальная и/или последующая терапия может включать любой или все из числа ингибиторов протеасом, таких как бортезомиб; ингибиторов гистондеацетилазы, таких как ромидеписин и белиногест; ингибиторов киназы, таких как ибрутиниб и иделализиб. В некоторых воплощениях начальная и/или последующая терапия может включать антитела, которые нацелены на CD20, такие как ритуксимаб, обинутумаб, офатумаб и ибритумаб тиуксетан; антитела, которые нацелены на CD52, такие как алемтумаб; антитела, которые нацелены на CD30, такие как

брентуксимаб, ведотин; интерферон; и иммуномодуляторы, такие как талидомид и леналидомид. В некоторых воплощениях начальная и/или последующая терапия может представлять собой комбинированную терапию, такую как CHOP, CHOP + R (или R-CHOP), CVP. EPOCH, EPOCH + R, DHAP и DHAP + R (или R-DHAP). CHOP включает лекарственные средства циклофосфамид, доксорубин, винкристин и преднизон. R-CHOP (или CHOP + R) дополнительно включает лечение ритуксимабом. CVP включает циклофосфамид, винкристин и преднизон. CVP также можно вводить в сочетании с ритуксимабом. EPOCH включает препараты этопозид, преднизон, винкристин, циклофосфамид и доксорубин. EPOCH-R дополнительно включает лечение ритуксимабом. В состав DHAP входят лекарственные средства дексаметазон, высокие дозы цитарабина и цисплатин. DHAP + R (или R-DHAP) дополнительно включает лечение ритуксимабом. Дополнительные схемы комбинирования, которые могут быть использованы в соответствии со способами, описанными в данном документе, включают любой один или несколько из числа бендамустина плюс ритуксимаб (BR); ритуксимаба, циклофосфамида, этопозид, прокарбазина и преднизона (R-CEPP); ритуксимаба, циклофосфамида, эпирубина и преднизона (R-CEOP); ритуксимаба, гемцитабина, цисплатина и дексаметазона (R-GDP); ритуксимаба и леналидомида. Дополнительные противоопухолевые терапии, которые могут быть использованы в соответствии со способами, описанными в настоящем документе, включают любой один или несколько или комбинацию из числа хлорамбуцила, бендамустина, циклофосфамида, флударабина, офатумумаба, обинутумаба, ритуксимаба, иделализиба, венетоклакса, леналидомона и метилпреднизона.

В некоторых воплощениях донор может вступить в первый рецидив после начального лечения заболевания и периода улучшения. В некоторых воплощениях период улучшения отмечается полным отсутствием признаков и симптомов заболевания. В некоторых воплощениях в течение периода улучшения признаки и симптомы заболевания облегчаются или уменьшаются, но не полностью отсутствуют. В некоторых воплощениях полное отсутствие признаков и симптомов заболевания или ослабление или уменьшение признаков и симптомов являются результатом первоначального лечения.

В некоторых воплощениях донор может вступить во второй рецидив после одной или нескольких предшествующих терапий заболевания и одного или нескольких периодов улучшения. В некоторых воплощениях период(ы) улучшения отмечены полным отсутствием признаков и симптомов заболевания. В некоторых воплощениях в течение периода(ов) улучшения признаки и симптомы заболевания облегчаются или уменьшаются, но не полностью отсутствуют. В некоторых воплощениях полное

отсутствие признаков и симптомов заболевания или ослабление или уменьшение признаков и симптомов являются результатом предшествующей терапии(ий).

В некоторых воплощениях рецидив диагностируется медицинским работником, который осматривает донора и подтверждает возвращение признаков и симптомов заболевания у донора. В некоторых воплощениях медицинским работником является лицо, имеющее лицензию в соответствии с медицинским регулирующим органом в стране, штате, провинции, округе, муниципалитете или поселке. Медицинский работник может включать, например, врача, такого как гематолог, иммунолог, онколог или практикующая медсестра. Медицинский работник, диагностирующий заболевание, и медицинский работник, диагностирующий рецидив, могут быть или не быть одним и тем же лицом.

В некоторых воплощениях клетки донорской крови получают аферезом или лейкоаферезом. В некоторых воплощениях количество клеток, когда их собирают у донора, и/или общее количество в образце афереза, составляет или около или не более чем или около 500×10^6 , 1000×10^6 , 2000×10^6 , 3000×10^6 , 4000×10^6 или 5000×10^6 или более общих клеток или суммарных ядросодержащих клеток. В некоторых воплощениях образец после введения объекту содержит от около 10^5 до 10^6 клеток или Т-клеток или сконструированных клеток на каждый килограмм веса донора и/или от около 5×10^6 или 10×10^6 всего клеток или Т-клеток или сконструированных клеток или их подмножеств. В некоторых воплощениях объем крови при сборе от донора составляет от 0,5 до 5 миллилитров на каждый килограмм массы донора.

В некоторых воплощениях клетки содержат и/или обогащены присутствием Т-клеток и/или их популяции. В некоторых воплощениях клетки содержат $CD4^+$ и/или $CD8^+$ Т-клетки, либо по отдельности, либо в комбинации. Среди подтипов и субпопуляций Т-клеток и/или $CD4^+$ и/или $CD8^+$ Т-клеток представлены наивные Т-клетки (T_N), эффекторные Т-клетки (T_{EFF}), Т-клетки памяти и их подтипы, такие как стволовые Т-клетки центральной памяти (T_{SCM}), Т-клетки центральной памяти (T_{CM}), Т-клетки эффекторной памяти (T_{EM}) или терминально дифференцированные Т-клетки эффекторной памяти, инфильтрирующие опухоль лимфоциты (T_{IL}), незрелые Т-клетки, зрелые Т-клетки, хелперные Т-клетки, цитотоксические Т-клетки, связанные слизистой оболочкой инвариантные Т-клетки ($MAIT$), природные и адаптивные регуляторные Т-клетки (T_{REG}), вспомогательные Т-клетки, такие как клетки T_H1 , клетки T_H2 , клетки T_H3 , клетки T_H17 , клетки T_H9 , клетки T_H22 клетки, фолликулярные хелперные Т-клетки, альфа/бета Т-клетки и дельта/гамма Т-клетки. В некоторых воплощениях изобретения клетки являются натуральными киллерами (NK). В некоторых воплощениях изобретения клетки

представляют собой моноциты или гранулоциты, например, миелоидные клетки, макрофаги, нейтрофилы, дендритные клетки, тучные клетки, эозинофилы и/или базофилы. В некоторых воплощениях Т-клетки содержат или представляют собой сообщество Т-клеток, таких как клеток, выбранных на основе экспрессии CD3, экспрессии CD4 или CD8 или отрицательных по не связанным с Т-клетками маркерам, обнаруженным на клетках крови.

В некоторых воплощениях клетка представляет собой или содержит Т-клетку, например, CD8⁺ Т-клетку (например, наивную CD8⁺Т-клетку, Т-клетку центральной памяти или Т-клетку эффекторной памяти), CD4⁺ Т-клетку, Т-клетку натурального киллера (NKT-клетки), регуляторную Т-клетку (T_{REG}), Т-клетку памяти стволовых клеток, лимфоидную клетку-предшественник, гемопоэтическую стволовую клетку, клетку натурального киллера (NK-клетку) или дендритную клетку. В некоторых воплощениях изобретения клетки представляют собой моноциты или гранулоциты, например, миелоидные клетки, макрофаги, нейтрофилы, дендритные клетки, тучные клетки, эозинофилы и/или базофилы. В воплощении клетка представляет собой индуцированную плюрипотентную стволовую (iPS) клетку или клетку, полученную из клетки iPS, например, клетку iPS, созданную из объекта, которую подвергают манипуляциям, чтобы изменять (например, вызывать мутацию) или манипулируют экспрессией одного или нескольких генов-мишеней, и которая дифференцируется, например, в Т-клетку, например, в CD8⁺ Т-клетку (например, в наивную CD8⁺ Т-клетку, в Т-клетку центральной памяти или в Т-клетку эффекторной памяти), CD4⁺ Т-клетку, стволовую Т-клетку памяти, лимфоидную клетку-предшественник или гемопоэтическую стволовую клетку.

В некоторых воплощениях клетки включают одно или несколько подмножеств Т-клеток или других типов клеток, таких как целые популяции Т-клеток, CD4⁺ клетки, CD8⁺ клетки и их субпопуляции, такие как те, которые определяются функцией, состоянием активации, зрелостью, потенциалом для дифференцировки, размножением, рециркуляцией, локализацией и/или персистентностью, антигенспецифичностью, типом антигенного рецептора, присутствием в конкретном органе или компартменте, профилем секреции маркера или цитокина и/или степенью дифференцировки.

В некоторых воплощениях среди подтипов и субпопуляций Т-клеток и/или CD4⁺ и/или CD8⁺ Т-клеток находятся наивные Т-клетки (T_N), эффекторные Т-клетки (T_{EFF}), Т-клетки памяти и их подтипы, такие как стволовые Т-клетки памяти (T_{SCM}), Т-клетки центральной памяти (T_{CM}), Т-клетки эффекторной памяти (T_{EM}) или терминально дифференцированные эффекторные Т-клетки памяти, инфильтрирующие опухоль лимфоциты (TIL), незрелые Т-клетки, зрелые Т-клетки, хелперные Т-клетки,

цитотоксические Т-клетки, ассоциированные со слизистой оболочкой инвариантные Т-клетки (MAIT), природные и адаптивные регуляторные Т-клетки (T_{REG}), хелперные Т-клетки, такие как клетки TH1, клетки TH2, клетки TH3, клетки TH17, клетки TH9, клетки TH22, фолликулярные хелперные Т-клетки, альфа/бета Т-клетки и дельта/гамма Т-клетки. В некоторых воплощениях клетки криогенно замораживают и/или криогенно хранят после сбора у донора без дальнейшей обработки. В некоторых воплощениях клетки обогащают один или несколько раз перед криогенным замораживанием и/или хранением. В некоторых воплощениях клетки обогащают один или несколько раз после криогенного хранения. В некоторых случаях отсутствие обогащения или дальнейшей обработки клеток перед криогенным замораживанием и/или хранением обеспечивает преимущество снижения затрат и/или экономии времени. В некоторых случаях отсутствие обогащения или дальнейшей обработки клеток перед криогенным замораживанием и/или хранением может также позволить более широкие возможности для сбора средств донорам, которые не имеют доступа к средствам, которые способны выполнять обогащение и/или обработку клеток. Обогащение может быть, например, таким, как описанное в публикации заявки РСТ № WO 2015/164675, полностью включенной в настоящий документ. В некоторых воплощениях клетки обрабатывают до криогенного замораживания и/или хранения.

В конкретных воплощениях клетки замораживают, например, после стадии промывания, например, для удаления плазмы и тромбоцитов. В некоторых воплощениях клетки замораживают до, после и/или во время любой из стадий, связанных с производством и/или получением клеток, например, $CD4^+$ и/или $CD8^+$ Т-клеток, которые экспрессируют рекомбинантный рецептор, например, CAR. В некоторых воплощениях такие стадии могут включать любые стадии, связанные с созданием сконструированных клеток, включая, без ограничения указанным, отбор и/или выделение подмножества клеток, например, $CD4^+$ и/или $CD8^+$ Т-клеток, стимуляцию и/или размножение клеток, например, Т-клеток или их подмножества, или трансфекцию или трансдукцию клеток. В некоторых воплощениях изобретения клетки представляют собой клетки образца афереза, собранного у объекта до отбора и/или выделения клеток, стимуляции и/или размножения клеток или трансфекции или трансдукции клеток.

Способы обработки клеток

В некоторых воплощениях клетки, собранные у объекта, промывают, например, для удаления фракции плазмы и помещения клеток в соответствующий буфер или среду для последующих стадий обработки. В некоторых воплощениях клетки промывают фосфатно-солевым буферным раствором (PBS). В некоторых воплощениях в растворе для промывки не хватает кальция и/или магния, и/или многих или всех двухвалентных

катионов. В некоторых аспектах стадия промывки выполняется с использованием полуавтоматической проточной центрифуги (например, клеточного процессора Cobe 2991, Baxter) в соответствии с инструкциями производителя. В некоторых аспектах стадия промывки выполняется в центрифужной камере, например, производимой и продаваемой Biosafe SA, в том числе для применения с системами Sepax[®] и Sepax[®] 2, включая центрифужные камеры A-200/F и A-200 в соответствии с инструкциями производителя. В некоторых аспектах стадия промывки выполняется посредством тангенциальной поточной фильтрации (TFF) в соответствии с инструкциями изготовителя. В некоторых воплощениях клетки ресуспендируют в различных биосовместимых буферах после промывания, таких как, например, PBS, не содержащем $\text{Ca}^{++}/\text{Mg}^{++}$. В определенных воплощениях компоненты образца клеток крови удаляют, и клетки непосредственно ресуспендируют в культуральной среде.

В некоторых воплощениях способы включают способы разделения клеток на основе плотности, такие как получение лейкоцитов из периферической крови путем лизиса эритроцитов и центрифугирования в градиенте перколлы или фиколла.

В некоторых воплощениях способы выделения включают разделение различных типов клеток на основе экспрессии или наличия в клетке одной или нескольких специфических молекул, таких как поверхностные маркеры, например, поверхностные белки, внутриклеточные маркеры или нуклеиновая кислота. В некоторых воплощениях может использоваться любой известный способ разделения на основе таких маркеров. В некоторых воплощениях разделение представляет собой разделение на основе аффинности или иммуноаффинности. Например, выделение в некоторых аспектах включает разделение клеток и популяций клеток на основе экспрессии клеток или уровня экспрессии одного или нескольких маркеров, обычно маркеров клеточной поверхности, например, путем инкубации с антителом или партнером по связыванию, который специфически связывается с такими маркерами, за которыми обычно следуют стадии промывки и отделения клеток, которые связывают антитело или связывающий партнер, от тех клеток, которые не связаны с антителом или связывающим партнером.

Такие стадии разделения могут быть основаны на положительном отборе, при котором клетки, имеющие связанные реагенты, сохраняются для дальнейшего применения, и/или отрицательном отборе, при котором клетки, не связанные с антителом или партнером по связыванию, сохраняются. В некоторых примерах обе фракции сохраняются для дальнейшего применения. В некоторых аспектах отрицательный отбор может быть особенно полезным, когда нет доступных антител, которые бы конкретно идентифицировали тип клеток в гетерогенной популяции, так что разделение лучше всего

проводить на основе маркеров, экспрессируемых клетками, отличными от искомой популяции.

Разделение не должно приводить к 100% обогащению или удалению конкретной клеточной популяции или клеток, экспрессирующих определенный маркер. В некоторых воплощениях обогащенная популяция содержит, по меньшей мере, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или 95% популяции. Например, положительный отбор или обогащение для клеток определенного типа, таких как клетки, экспрессирующие маркер, относится к увеличению количества или процента таких клеток, но не обязательно приводит к полному отсутствию клеток, не экспрессирующих маркер. Аналогично, отрицательный отбор, удаление или истощение клеток определенного типа, таких как клетки, экспрессирующие маркер, относится к уменьшению количества или процента таких клеток, но не должно приводить к полному удалению всех таких клеток.

В некоторых примерах выполняется несколько раундов стадий разделения, где положительно или отрицательно выбранная фракция из одной стадии подвергается другой стадии разделения, такой как последующий положительный или отрицательный отбор. В некоторых примерах одна стадия разделения может истощать клетки, экспрессирующие несколько маркеров одновременно, например, путем инкубации клеток с множеством антител или партнеров по связыванию, каждый из которых специфичен для маркера, нацеленного на отрицательный отбор. Аналогичным образом, несколько типов клеток могут одновременно быть положительно выбраны путем инкубации клеток с множеством антител или партнеров по связыванию, экспрессируемых на различных типах клеток.

Например, в некоторых аспектах специфические субпопуляции Т-клеток, такие как клетки, положительные или экспрессирующие высокие уровни одного или нескольких поверхностных маркеров, например, CD28⁺, CD62L⁺, CCR7⁺, CD27⁺, CD127⁺, CD4⁺, CD8⁺ CD45RA⁺ и/или CD45RO⁺ Т-клетки, выделяют методами положительного или отрицательного отбора.

Например, CD3⁺, CD28⁺ Т-клетки могут быть положительно отобраны с использованием CD3/CD28-конъюгированных магнитных шариков (например, DYNABEADS® M-450 CD3/CD28 T Cell Expander).

В некоторых воплощениях выделение осуществляется путем обогащения определенной популяции клеток путем положительного отбора или истощения определенной популяции клеток путем отрицательного отбора. В некоторых воплощениях положительный или отрицательный отбор осуществляется путем инкубации клеток с одним или несколькими антителами или другим связывающим агентом, которые специфически связываются с одним или несколькими поверхностными маркерами,

экспрессированными (маркер⁺) или экспрессированными на относительно более высоком уровне (высокий уровень маркера) на положительно или отрицательно отобранные клетки, соответственно.

В некоторых воплощениях Т-клетки отделяют от образца РВМС путем отрицательного отбора маркеров, экспрессируемых на не-Т-клетках, таких как В-клетки, моноциты или другие лейкоциты, такие как CD14. В некоторых аспектах стадия отбора CD4⁺ или CD8⁺ используется для разделения CD4⁺ хелперов и CD8⁺ цитотоксических Т-клеток. Такие популяции CD4⁺ и CD8⁺ могут быть далее отсортированы в подпопуляции путем положительного или отрицательного отбора маркеров, экспрессируемых или экспрессируемых в относительно более высокой степени в одной или нескольких субпопуляциях наивных Т-клеток, Т-клеток памяти и/или эффекторных Т-клеток.

В некоторых воплощениях CD8⁺ клетки дополнительно обогащаются или истощаются по отношению к наивным клеткам, клеткам центральной памяти, клеткам эффекторной памяти и/или стволовым клеткам центральной памяти, например, положительным или отрицательным отбором на основе поверхностных антигенов, связанных с соответствующей субпопуляцией. В некоторых воплощениях обогащение Т-клеток центральной памяти (Т_{CM}) проводят для повышения эффективности, например, для улучшения долгосрочной выживаемости, размножения и/или приживления после введения, которое в некоторых аспектах является особенно устойчивым в таких субпопуляциях. См. Terakura et al. (2012) Blood. 1:72–82; Wang et al. (2012) J Immunother. 35(9):689-701. В некоторых воплощениях объединение TCM-обогащенных CD8⁺ Т-клеток и CD4⁺ Т-клеток дополнительно повышает эффективность.

В воплощениях Т-клетки памяти присутствуют как в CD62L⁺, так и в CD62L⁻ подмножествах CD8⁺ лимфоцитов периферической крови. РВМС может быть обогащен или истощен фракциями CD62L⁻ CD8⁺ и/или CD62L⁺ CD8⁺, например, с использованием антител против CD8 и против CD62L.

В некоторых воплощениях обогащение Т-клеток (Т_{CM}) центральной памяти основано на положительной или высокой поверхностной экспрессии CD45RO, CD62L, CCR7, CD28, CD3 и/или CD127; в некоторых аспектах оно основано на отрицательном отборе клеток, экспрессирующих или высокоэкспрессирующих CD45RA и/или гранзим В. В некоторых аспектах выделение популяции CD8⁺ обогащенной клетками TCM, осуществляется путем истощения клеток, экспрессирующих CD4, CD14, CD45RA, а положительный отбор или обогащение для клеток, экспрессирующих CD62L. В одном аспекте обогащение Т-клеток центральной памяти (Т_{CM}) осуществляют, начиная с отрицательной фракции клеток, отобранных на основе экспрессии CD4, которая

подвергается отрицательному отбору на основе экспрессии CD14 и CD45RA и положительному отбору на основе CD62L. Такие отборы в некоторых аспектах выполняются одновременно, а в других аспектах - последовательно, в любом порядке. В некоторых аспектах одна и та же стадия отбора на основе экспрессии CD4, используемая при получении популяции или субпопуляции CD8⁺ клеток, также используется для получения популяции или субпопуляции клеток CD4⁺, так что как положительные, так и отрицательные фракции из разделения на основе CD4 сохраняются и используются на последующих стадиях способов, необязательно после одного или нескольких дополнительных стадий положительного или отрицательного отбора.

В конкретном примере образец PBMC или другой образец лейкоцитов подвергают отбору CD4⁺ клеток, при этом сохраняются как отрицательная, так и положительная фракции. Отрицательная фракция затем подвергается отрицательному отбору на основе экспрессии CD14 и CD45RA или ROR1 и положительному отбору на основе маркерным характеристикам особенностям Т-клеток центральной памяти, таким как CD62L или CCR7, где положительный и отрицательный отбор проводятся в любом порядке.

CD4⁺ Т-хелперные клетки сортируются на наивные, центральные и эффекторные клетки путем идентификации популяций клеток, имеющих антигены клеточной поверхности. CD4⁺ лимфоциты могут быть получены стандартными способами. В некоторых воплощениях, наивные CD4⁺ Т-лимфоциты представляют собой CD45RO⁻, CD45RA⁺, CD62L⁺, CD4⁺ Т-клетки. В некоторых воплощениях CD4⁺ клетки центральной памяти представляют собой CD62L⁺ и CD45RO⁺. В некоторых воплощениях эффекторными CD4⁺ клетками являются CD62L⁻ и CD45RO⁻.

В одном примере для обогащения CD4⁺ клеток путем отрицательного отбора коктейль моноклональных антител обычно включает антитела к CD14, CD20, CD11b, CD16, HLA-DR и CD8. В некоторых воплощениях антитело или связывающий партнер связаны с твердой подложкой или матрицей, такой как магнитный шарик или парамагнитный шарик, чтобы обеспечить разделение клеток для положительного и/или отрицательного отбора. Например, в некоторых воплощениях клетки и популяции клеток разделяют или выделяют с использованием иммуномагнитных (или аффинно-магнитных) методов разделения (рассмотрено в *Methods in Molecular Medicine*, vol. 58: *Metastasis Research Protocols*, Vol. 2: *Cell Behavior In Vitro and In Vivo*, p 17-25 Edited by: S. A. Brooks and U. Schumacher © Humana Press Inc., Totowa, NJ).

В некоторых аспектах две или более стадии отбора могут выполняться последовательно. Например, образец или композиция клеток, подлежащих разделению, подвергается отбору CD8⁺ клеток, где сохраняются как отрицательная, так и

положительная фракции. Отрицательная по CD8 фракция может быть дополнительно подвергнута отбору CD4⁺ клеток. В некоторых аспектах образец или состав клеток, подлежащих разделению, подвергают отбору CD4⁺ клеток, при этом сохраняются как отрицательные, так и положительные фракции, а отрицательная фракция CD4 может подвергаться отбору CD8⁺ клеток. Примерные способы отбора клеток описаны в патентных заявках PCT с номерами WO 2015/157384 и/или WO 2015/164675, которые включены ссылкой во всей их полноте, все или часть которых могут быть использованы в связи со способами, описанными в данном документе.

В некоторых аспектах образец или композицию клеток, подлежащих разделению, инкубируют с небольшим намагничиваемым или магнитно-чувствительным материалом, таким как магнитно-чувствительные частицы или микрочастицы, такие как парамагнитные шарики (например, такие как шарики Dynalbeads или шарики MACS). Магнитно-чувствительный материал, например, частица, обычно прямо или косвенно связан с партнером по связыванию, например, антителом, которое специфически связывается с молекулой, например, поверхностным маркером, присутствующим на клетке, клетках или популяции клеток, которые желательно отделить, например, от того, что желательно отобрать отрицательно или положительно.

В некоторых воплощениях магнитная частица или шарик содержат магнитно-чувствительный материал, связанный с конкретным связывающим элементом, таким как антитело или другой связывающий партнер. Существует много известных магнитно-чувствительных материалов, используемых в способах магнитного разделения. Подходящие магнитные частицы включают те, которые описаны в Molday, пат. США № 4,452,773, и в Европейском патенте EP 452342 B, которые включены в настоящее описание ссылкой. Частицы коллоидного размера, такие как описанные в патенте США Owen 4,795,698, и патенте США Liberti et al., 5,200,084 являются другими примерами, которые настоящим включены ссылкой.

Инкубацию обычно проводят в условиях, при которых антитела или партнеры по связыванию или молекулы, такие как вторичные антитела или другие реагенты, которые специфически связываются с такими антителами или партнерами по связыванию, которые прикреплены к магнитной частице или шарiku, специфически связываются с молекулами клеточной поверхности, если они присутствуют на клетках в образце.

В некоторых аспектах образец помещают в магнитное поле, и те клетки, к которым прикреплены магниточувствительные или намагничиваемые частицы, будут притягиваться к магниту и отделяться от немеченых клеток. При положительном отборе клетки, которые притягиваются к магниту, сохраняются; при отрицательном отборе

сохраняются клетки, которые не притягиваются (клетки без метки). В некоторых аспектах комбинация положительного и отрицательного отбора выполняется во время одной и той же стадии отбора, где положительные и отрицательные фракции сохраняются и дополнительно обрабатываются или подвергаются дополнительным стадиям разделения.

В некоторых воплощениях магнитно-чувствительные частицы покрыты первичными антителами или другими связывающими партнерами, вторичными антителами, лектинами, ферментами или стрептавидином. В определенных воплощениях магнитные частицы прикрепляются к клеткам посредством покрытия первичными антителами, специфичными для одного или нескольких маркеров. В некоторых воплощениях клетки, а не шарики, метят первичным антителом или партнером по связыванию, и затем добавляют магнитные частицы, покрытые специфическим к типу клеток вторичным антителом или другим партнером по связыванию (например, стрептавидином). В некоторых воплощениях магнитные частицы, покрытые стрептавидином, используются в сочетании с биотинилированными первичными или вторичными антителами.

В некоторых воплощениях магниточувствительные частицы оставляют прикрепленными к клеткам, которые должны быть впоследствии инкубированы, культивированы и/или сконструированы; в некоторых аспектах частицы остаются прикрепленными к клеткам для введения пациенту. В некоторых воплощениях намагничиваемые или магниточувствительные частицы удаляются из клеток. Способы удаления намагничиваемых частиц из клеток известны и включают, например, применение конкурирующих немеченых антител, намагничиваемых частиц или антител, конъюгированных с расщепляемыми линкерами, и т.д. В некоторых воплощениях намагничиваемые частицы являются биоразлагаемыми.

В некоторых воплощениях основанный на аффинности отбор осуществляется посредством магнитно-активированной сортировки клеток (MACS) (Miltenyi Biotech, Оберн, Калифорния). Системы магнитно-активированной сортировки клеток (MACS) способны отбирать клетки высокой чистоты, к которым прикреплены намагниченные частицы. В определенных воплощениях MACS работает в режиме, в котором нецелевые и целевые виды последовательно элюируются после приложения внешнего магнитного поля. То есть клетки, прикрепленные к намагниченным частицам, удерживаются на месте, в то время как незакрепленные частицы элюируются. Затем, после того как эта первая стадия элюирования завершена, виды, которые были захвачены в магнитном поле и не были элюированы, освобождаются каким-либо образом, так чтобы их можно было элюировать и извлекать. В некоторых воплощениях нецелевые клетки метятся и истощаются из

гетерогенной популяции клеток.

В некоторых воплощениях выделение или разделение осуществляют с использованием системы, устройства или аппарата, которые выполняют одну или несколько стадий способов выделения, подготовки, разделения, обработки, инкубации, культивирования и/или приготовления. В некоторых аспектах система используется для выполнения каждой из этих стадий в закрытой или стерильной среде, например, чтобы минимизировать ошибки, пользовательскую обработку и/или загрязнение. В одном примере система представляет собой систему, описанную в публикации патентной заявки РСТ № WO 2009/072003 или публикации патентной заявки США № 2011/0003380 A1, которые включены в настоящий документ ссылкой. В некоторых аспектах продукт для афереза или лейкофереза или полученный из него образец обрабатывают и/или осуществляют выделение или отбор с использованием системы, устройства, аппарата и/или способа, как описано в публикации патентной заявки РСТ № WO 2016/073602 или публикации патентной заявки США № 2016/0122782, содержание которых включено ссылкой во всей их полноте. В некоторых воплощениях выделение или разделение проводят в соответствии со способами, описанными в публикации патентной заявки РСТ № WO 2015/164675, содержание которой полностью включено ссылкой.

В некоторых воплощениях система или устройство выполняет один или несколько, например, все стадии выделения, обработки, проектирования и составления в интегрированной или автономной системе и/или автоматизированным или программируемым образом. В некоторых аспектах система или устройство включает компьютер и/или компьютерную программу, связанную с системой или устройством, которая позволяет пользователю программировать, контролировать, оценивать результат и/или регулировать различные аспекты стадий обработки, выделения, проектирования и составления.

В некоторых аспектах разделение и/или другие стадии проводят с использованием системы CliniMACS (Miltenyi Biotec), например, для автоматического разделения клеток на уровне клинического масштаба в закрытой и стерильной системе. Компоненты могут включать встроенный микрокомпьютер, блок магнитного разделения, перистальтический насос и различные пережимные клапаны. Встроенный компьютер в некоторых аспектах контролирует все компоненты прибора и дает указание системе выполнять повторяющиеся процедуры в стандартизированной последовательности. Блок магнитного разделения в некоторых аспектах включает подвижный постоянный магнит и держатель для селекционной колонки. Перистальтический насос контролирует скорость потока по всему комплекту трубок и вместе с пережимными клапанами обеспечивает

контролируемый поток буфера через систему и постоянную суспензию клеток.

Система CliniMACS в некоторых аспектах использует связанные с антителами намагничиваемые частицы, которые поставляются в стерильном непирогенном растворе. В некоторых воплощениях после маркировки клеток магнитными частицами клетки промывают для удаления избыточных частиц. Затем мешок для подготовки клеток соединяется с комплектом трубок, который, в свою очередь, соединяется с пакетом, содержащим буфер и мешок для сбора клеток. Комплект трубок состоит из предварительно собранных стерильных трубок, включая предварительную колонку и разделительную колонку, и предназначен только для одноразового применения. После запуска программы разделения система автоматически наносит образец клеток на разделительную колонку. Меченые клетки сохраняются в колонке, в то время как немеченые клетки удаляются с помощью ряда стадий промывания. В некоторых воплощениях клеточные популяции для применения со способами, описанными в данном документе, являются немечеными и не сохраняются в колонке. В некоторых воплощениях клеточные популяции для применения со способами, описанными в данном документе, помечены и сохранены в колонке. В некоторых воплощениях клеточные популяции для применения в описанных в данном документе способах элюируют из колонки после удаления магнитного поля и собирают в мешок для сбора клеток.

В некоторых воплощениях разделение и/или другие стадии проводят с использованием системы CliniMACS Prodigy (Miltenyi Biotec). Система CliniMACS Prodigy в некоторых аспектах оснащена блоком обработки клеток, который позволяет автоматически промывать и фракционировать клетки центрифугированием. Система CliniMACS Prodigy также может включать встроенную камеру и программное обеспечение для распознавания изображений, которое определяет оптимальную конечную точку фракционирования клетки путем определения макроскопических слоев исходного продукта клеток. Например, периферическая кровь может быть автоматически разделена на эритроциты, лейкоциты и слои плазмы. Система CliniMACS Prodigy также может включать интегрированную камеру для культивирования клеток, которая выполняет протоколы клеточных культур, такие как, например, дифференцировка и размножение клеток, загрузка антигена и длительное культивирование клеток. Входные порты могут обеспечить стерильное удаление и пополнение носителя, а клетки можно контролировать с помощью встроенного микроскопа. См., например, Klebanoff et al. (2012) *J Immunother.* 35(9): 651–660, Terakura et al. (2012) *Blood*. 117:72–82, and Wang et al. (2012) *J Immunother.* 35 (9): 689-701.

В некоторых воплощениях популяция клеток, описанная в данном документе,

собирается и обогащается (или истощается) посредством проточной цитометрии, в которой клетки, окрашенные для множества маркеров клеточной поверхности, переносятся в жидком потоке. В некоторых воплощениях популяция клеток, описанная в данном документе, собирается и обогащается (или истощается) посредством сортировки по препаративной шкале (FACS). В определенных воплощениях популяция клеток, описанная в данном документе, собирается и обогащается (или истощается) путем применения микроэлектромеханических систем (MEMS) в сочетании с системой обнаружения на основе FACS. См., например, WO 2010/033140, Cho et al. (2010) *Lab Chip* 10, 1567-1573; и Godin et al. (2008) *J Biophoton.* 1(5):355–376. В обоих случаях клетки могут быть помечены несколькими маркерами, что позволяет выделить четко определенные подмножества Т-клеток с высокой степенью чистоты.

В некоторых воплощениях антитела или партнеры связывания помечены одним или несколькими детектируемыми маркерами для облегчения разделения для положительного и/или отрицательного отбора. Например, разделение может быть основано на связывании с флуоресцентно меченными антителами. В некоторых примерах разделение клеток на основе связывания антител или других партнеров связывания, специфичных для одного или нескольких маркеров клеточной поверхности, осуществляется в жидком потоке, например, с помощью активированной флуоресценцией сортировке клеток (FACS), включая препаративный масштаб (FACS), и/или микроэлектромеханические систем (MEMS), например, в сочетании с проточной цитометрической системой обнаружения. Такие способы допускают положительный и отрицательный отбор на основе нескольких маркеров одновременно.

В некоторых воплощениях способы получения включают стадии замораживания, например, криоконсервации клеток, до или после выделения, инкубации и/или конструирования. В некоторых воплощениях стадия замораживания и последующего оттаивания удаляет гранулоциты и, в некоторой степени, моноциты в клеточной популяции. В некоторых воплощениях клетки суспендируют в замораживающем растворе, например, после стадии промывания для удаления плазмы и тромбоцитов. В некоторых аспектах может быть использовано любое из множества известных растворов и параметров замораживания. Один пример включает использование PBS, содержащего около 20% диметилсульфоксида (DMSO) и около 8% человеческого сывороточного альбумина (HSA) или других подходящих сред для замораживания клеток. В некоторых аспектах раствор затем разбавляют 1: 1 средой, так что конечная концентрация DMSO и HSA составляет 10% и 4%, соответственно. Затем клетки замораживают до -80°C со скоростью 1° в минуту и хранят в паровой фазе резервуара для хранения жидкого азота.

В некоторых аспектах может быть использовано любое из множества известных растворов и параметров замораживания. В некоторых воплощениях образец клетки может содержать среду для криоконсервации или витрификации или раствор, содержащий криопротектор. Подходящие криопротекторы включают, без ограничения указанным, DMSO, глицерин, гликоль, пропиленгликоль, этиленгликоль, пропандиол, полиэтиленгликоль (PEG), 1,2-пропандиол (PROH) или их смесь. В некоторых примерах раствор для криоконсервации может содержать один или несколько не проникающих в клетки криоконсервантов, включая, без ограничения указанным, поливинилпирролидон, гидроксипропилкрахмал, полисахарид, моносахарид, альгинат, трегалозу, раффинозу, декстран, человеческий сывороточный альбумин, фикоил, липопротеины, поливинилпирролидон, гидроксипропилкрахмал, аутологичную плазму или их смесь. В некоторых воплощениях клетки суспендируют в замораживающем растворе с конечной концентрацией криопротектора от около 1% до около 20%, от около 3% до около 9% или от около 6% до около 9% по объему. В некоторых воплощениях конечная концентрация криопротектора в замораживающем растворе составляет около 3%, около 4%, около 5%, около 5,5%, около 6%, около 6,5%, около 7%, около 7,5%, около 8%, около 8,5%, около 9%, около 9,5% или около 10% по объему.

В конкретных воплощениях клетки суспендируют в замораживающем растворе с конечной концентрацией DMSO от около 1% до около 20%, от около 3% до около 9% или от около 6% до около 9% по объему. В некоторых воплощениях конечная концентрация DMSO в замораживающем растворе составляет около 3%, около 4%, около 5%, около 5,5%, около 6%, около 6,5%, около 7%, около 7,5%, около 8%, около 8,5%, около 9%, около 9,5% или около 10% по объему.

В некоторых воплощениях композиция заключена в один или несколько пакетов, подходящих для криоконсервации (например, CryoMacs[®] Freezing Bags, Miltenyi Biotec). В некоторых воплощениях композиция заключена в один или несколько флаконов, подходящих для криоконсервации (например, CellSeal[®] Vials, Cook Regentec).

В некоторых воплощениях предоставленные способы включают стадии культивирования, инкубации, культивирования и/или генной инженерии либо до, либо после стадии криоконсервации. В некоторых воплощениях, по меньшей мере, стадия генной инженерии выполняется после стадии криоконсервации. Например, в некоторых воплощениях предоставлены способы инкубации и/или конструирования криоконсервированных клеточных популяций.

Таким образом, в некоторых воплощениях клеточные популяции инкубируют в композиции, иницирующей культуру. Инкубацию и/или конструирование можно

проводить в сосуде для культивирования, таком как блок, камера, лунка, колонка, пробирка, набор трубок, клапан, флакон, культуральная чашка, мешок или другой контейнер для культуры или культивирования клеток.

В некоторых воплощениях клетки инкубируют и/или культивируют до или в связи с генной инженерией. Стадии инкубации могут включать культивацию, культивирование, стимуляцию, активацию и/или размножение. В некоторых воплощениях композиции или клетки инкубируют в присутствии стимулирующих условий или стимулирующего агента. Такие условия включают условия, предназначенные для того, чтобы индуцировать пролиферацию, экспансию, активацию и/или выживание клеток в популяции, имитировать воздействие антигена и/или праймировать клетки для генной инженерии, например, для введения рекомбинантного антигенного рецептора.

Условия могут включать один или несколько из конкретных сред, температуры, содержания кислорода, содержания диоксида углерода, времени, агентов, например, питательных веществ, аминокислот, антибиотиков, ионов и/или стимулирующих факторов, таких как цитокины, хемокины, антигены, партнеры связывания, слитые белки, рекомбинантные растворимые рецепторы и любые другие агенты, предназначенные для активации клеток. В некоторых аспектах клетки инкубируют в присутствии одного или нескольких цитокинов, и в некоторых воплощениях можно использовать коктейль цитокинов, например, как описано в публикации патентной заявки РСТ № 2015/157384, которая включена в настоящий документ ссылкой. В некоторых воплощениях клетки инкубируют с одним или несколькими цитокинами и/или коктейлем цитокинов до, одновременно или после трансдукции.

В некоторых воплощениях стимулирующие условия или агенты включают один или несколько агентов, например, лиганд, который способен активировать внутриклеточный сигнальный домен комплекса TCR. В некоторых аспектах агент включает или инициирует внутриклеточный сигнальный каскад TCR/CD3 в Т-клетке. Такие агенты могут включать антитела, такие как антитела, специфичные для TCR, например, анти-CD3. В некоторых воплощениях стимулирующие состояния включают один или несколько агентов, например, лиганд, который способен стимулировать костимулирующий рецептор, например, анти-CD28. В некоторых воплощениях такие агенты и/или лиганды могут быть связаны с твердой подложкой, такой как шарик, и/или одним или несколькими цитокинами. Необязательно, способ размножения может дополнительно включать стадию добавления анти-CD3 и/или анти-CD28-антитела к культуральной среде (например, в концентрации, по меньшей мере, около 0,5 нг/мл). В некоторых воплощениях стимулирующие агенты включают IL-2, IL-15 и/или IL-7. В

некоторых аспектах концентрация IL-2 составляет, по меньшей мере, около 10 единиц/мл.

В некоторых аспектах инкубацию проводят в соответствии со способами, такими как те, которые описаны в патенте США № 6040177, выданном Riddell et al., Klebanoff et al. (2012) J Immunother. 35(9): 651–660, Terakura et al. (2012) Blood. 117:72–82, и/или Wang et al. (2012) J Immunother. 35(9):689–701. В некоторых аспектах инкубация осуществляется с использованием системы, устройства, аппарата и/или способа, как описано в публикации патентной заявки PCT № WO 2016/073602 или US 2016/0122782, содержание которых полностью включено ссылкой. В некоторых воплощениях инкубацию и/или культивирование проводят в соответствии со способами, описанными в публикации патентной заявки PCT № WO 2015/164675, содержание которой полностью включено ссылкой.

В некоторых воплощениях Т-клетки размножают путем добавления к композиции, инициирующей культуру, фидерных клеток, таких как неделящиеся моноклеарные клетки периферической крови (РВМС) (например, так, чтобы полученная популяция клеток содержала, по меньшей мере, около 5, 10, 20 или 40 или более фидерных клеток РВМС для каждого Т-лимфоцита в исходной популяции, которая будет размножена); и инкубирование культуры (например, в течение времени, достаточного для увеличения числа Т-клеток). В некоторых аспектах неделящиеся фидерные клетки могут содержать гамма-облученные фидерные клетки РВМС. В некоторых воплощениях РВМС облучают гамма-лучами в диапазоне от около 3000 до 3600 рад для предотвращения деления клеток. В некоторых аспектах питающие клетки добавляют в культуральную среду перед добавлением популяций Т-клеток.

В некоторых воплощениях стимулирующие условия включают температуру, подходящую для роста человеческих Т-лимфоцитов, например, по меньшей мере, около 25 градусов Цельсия, обычно, по меньшей мере, около 30 градусов и, как правило, около или около 37 градусов Цельсия. Необязательно, инкубация может дополнительно включать добавление неделящихся EBV-трансформированных лимфобластоидных клеток (LCL) в качестве фидерных клеток. LCL можно облучать гамма-лучами в диапазоне от 6000 до 10000 рад. Фидерные клетки LCL в некоторых аспектах представлены в любом подходящем количестве, таком как отношение фидерных клеток LCL к исходным Т-лимфоцитам, по меньшей мере, около 10:1.

В воплощениях антиген-специфические Т-клетки, такие как антиген-специфичные CD4⁺ и/или CD8⁺ Т-клетки, получают путем стимуляции наивных или антиген-специфических Т-лимфоцитов антигеном. Например, антигенспецифические линии или клоны Т-клеток могут получать для цитомегаловирусных антигенов путем выделения Т-

клеток от инфицированных объектов и стимуляции клеток *in vitro* тем же антигеном.

В некоторых воплощениях клетки обогащают перед криогенным замораживанием и/или хранением. Преимущества обогащения клеток перед криогенным замораживанием и/или их хранением могут включать экономию времени. Например, когда реципиенту нужны клетки как часть заместительной терапии, клетки можно размораживать из криогенного хранилища и вводить реципиенту без дальнейших манипуляций. В некоторых воплощениях способы включают обогащение типа или типов клеток. В некоторых воплощениях обогащенные клетки представляют собой Т-клетки. В некоторых воплощениях $CD4^+$ Т-клетки обогащены. В некоторых воплощениях $CD8^+$ Т-клетки обогащены. В некоторых воплощениях и $CD4^+$ и $CD8^+$ Т-клетки обогащены. В некоторых воплощениях $CD4^+$ и $CD8^+$ Т-клетки обогащаются в отдельных процессах. В некоторых воплощениях $CD4^+$ и $CD8^+$ Т-клетки обогащаются за один процесс. Обогащение $CD4^+$ и/или $CD8^+$ Т-клеток может проводиться, например, как описано в публикации заявки РСТ № WO 2015/164675, полностью включенной в настоящий документ.

В некоторых воплощениях клетки анализируют перед хранением в криогенных условиях. В некоторых воплощениях клетки можно анализировать для измерения активности клеток. В некоторых воплощениях активность представляет собой биологическую функцию клеток. В некоторых воплощениях активность представляет собой способность клеток содействовать иммунологическому процессу, включая созревание В-клеток в плазматические клетки и/или В-клетки памяти, активацию цитотоксических Т-клеток и/или макрофагов и т.д. В некоторых воплощениях активность - это способность клеток связываться со специфическими лигандами или антигенами с использованием рецепторов, рецептор-подобных молекул, антител или антителоподобных молекул. В некоторых воплощениях активность представляет собой способность клеток распознавать и уничтожать инфицированные вирусом клетки и опухолевые клетки. В некоторых воплощениях клетки анализируют для измерения другой биологической функции клеток, которая связана или влияет на активность клеток.

Стадии отбора клеток и/или обработки также могут быть, например, такими, как описано в WO2017214207, содержание которой настоящим полностью включено ссылкой, и/или WO2016073602, содержание которой полностью включено в настоящее описание ссылкой.

Криогенные способы замораживания

В некоторых воплощениях клетки, например, замораживают при определенной плотности клеток, например, при известной или контролируемой плотности клеток. В некоторых воплощениях плотность клеток во время процесса замораживания может

влиять на гибель клеток и/или повреждение клеток, которое происходит во время и/или вследствие процесса замораживания.

Например, в конкретных воплощениях плотность клеток влияет на равновесие, например, осмотическое равновесие с окружающей средой во время процесса замораживания. В некоторых воплощениях это равновесие представляет собой, включает и/или приводит к дегидратации. В некоторых воплощениях дегидратация представляет собой или включает дегидратацию клеток, которая происходит при контакте, комбинации и/или инкубации с замораживающим раствором, например, DMSO и/или раствором, содержащим DMSO. В конкретных воплощениях дегидратация представляет собой или включает дегидратацию, возникающую в результате зарождения и увеличения кристаллов льда во внеклеточном пространстве, например, путем уменьшения эффективной концентрации жидкой воды, экспонированной клеткам. В некоторых воплощениях клетки замораживаются при плотности клеток, которая приводит к более медленной и/или менее быстрой дегидратации, чем клетки, которые замораживаются при другой, например, более высокой или более низкой плотности клеток. В некоторых воплощениях клетки замораживают при плотности клеток, которая дает примерно, по меньшей мере, или 5%, 10%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 125%, 150%, 175%, 200%, 1-кратно, 2-кратно, 3-кратно, 4-кратный, 5-кратно, 10-кратно, 50-кратно или 100-кратно более медленное обезвоживание, чем когда клетки замерзали бы при другой плотности клеток, например, выше или ниже, в тех же или похожих условиях.

В некоторых воплощениях, клетки суспендируют в замораживающем растворе при плотности между или в диапазоне от около 1×10^6 клеток/мл до около 1×10^8 клеток/мл, в диапазоне от около 1×10^6 клеток/мл до около 2×10^7 клеток/мл, от около 1×10^7 клеток/мл до около 5×10^7 клеток/мл или от около 1×10^7 клеток/мл до 5×10^7 клеток/мл, в каждом случае включительно. В некоторых воплощениях клетки суспендируют в замораживающем растворе с плотностью около 1×10^6 клеток/мл, около 2×10^6 клеток/мл, около 5×10^6 клеток/мл, около 1×10^7 клеток/мл, около $1,5 \times 10^7$ клеток/мл, около 2×10^7 клеток/мл, около $2,5 \times 10^7$ клеток/мл, около $2,5 \times 10^7$ клеток/мл, около $2,5 \times 10^7$ клеток/мл, около 3×10^7 клеток/мл, около $3,5 \times 10^7$ клеток/мл, около 4×10^7 клеток/мл, около $4,5 \times 10^7$ клеток/мл или около 5×10^7 клеток/мл, в каждом случае включительно. В определенных воплощениях клетки суспендируют в замораживающем растворе с плотностью от около $1,5 \times 10^7$ клеток/мл до около 6×10^7 клеток/мл, включительно. В определенных воплощениях клетки суспендируют в замораживающем растворе с плотностью, по меньшей мере, около 1×10^7 клеток/мл. В некоторых воплощениях клетки суспендируют в замораживающем растворе с плотностью от около 5×10^6 клеток/мл до

около 150×10^6 клеток/мл включительно. В конкретных воплощениях клетки суспендируют в замораживающем растворе с плотностью, по меньшей мере, около $1,5 \times 10^7$ клеток/мл. В некоторых воплощениях клетки являются жизнеспособными клетками. В некоторых воплощениях плотность клеток определяется диаметром Т-клеток.

В некоторых воплощениях клетки замораживают в одном или нескольких контейнерах. В определенных воплощениях контейнер представляет собой морозильный контейнер и/или контейнер с криопротектором. Контейнеры, подходящие для криогенного замораживания, включают, без ограничения указанным, флаконы, пакеты, например, пластиковые пакеты и держатели для пробирок (каны). В конкретных воплощениях клетки, например, клетки одной и той же клеточной композиции, такой как клеточная композиция, содержащая клетки, экспрессирующие CAR, замораживают в 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 10 или более чем 10 отдельных контейнерах. Например, в некоторых воплощениях клетки и/или композиция клеток суспендируют в объеме, например, таком как раствор, среда для замораживания и/или криопротектор, и который больше, чем объем, подходящий для контейнера, и поэтому объем помещается в два или более контейнеров. В некоторых воплощениях объем составляет, составляет около или составляет менее 100 мл, 50 мл, 25 мл, 20 мл, 15 мл, 10 мл, 5 мл или менее 5 мл, и клетки замораживают в двух, трех, четырех, пяти, шести, семи, восьми, девяти, десяти или более десяти отдельных флаконах. В конкретных воплощениях одинаковый объем клеток помещают в каждый флакон. В некоторых воплощениях флаконы представляют собой идентичные флаконы, например, флаконы одного и того же производителя, модели и/или производственной партии. В конкретных воплощениях объем составляет, составляет около или превышает 10 мл, 15 мл, 20 мл, 25 мл, 30 мл, 40 мл, 50 мл, 60 мл, 70 мл, 80 мл, 90 мл, 100 мл, 120 мл, 150 мл, 200 мл или более 200 мл, и клетки замораживают в двух, трех, четырех, пяти, шести, семи, восьми, девяти, десяти или более десяти отдельных пакетах. В конкретных воплощениях одинаковый объем клеток помещается в каждый пакет. В некоторых воплощениях пакеты представляют собой идентичные пакеты, например, пакеты одного и того же производителя, модели и/или производственной партии.

В некоторых воплощениях контейнер представляет собой флакон. В некоторых воплощениях контейнер представляет собой флакон с объемом наполнения, равным или около 0,5 мл, 1 мл, 2 мл, 3 мл, 4 мл, 5 мл, 6 мл, 7 мл, 8 мл, 9 мл, 10 мл, 11 мл, 12 мл, 13 мл, 14 мл, 15 мл, 16 мл, 17 мл, 18 мл, 19 мл, 20 мл, 25 мл, 30 мл, 35 мл, 40 мл, 45 мл, или 50 мл. В некоторых воплощениях флакон имеет объем наполнения от 1 до 120 мл, от 1 до 20 мл, от 1 до 5 мл, от 1 до 10 мл, от 1 до 40 мл или от 20 до 40 мл, в каждом случае

включительно. В некоторых воплощениях флакон представляет собой флакон для замораживания, флакон с криопротектором и/или криопробирку. Подходящие флаконы известны и включают, без ограничения указанным, флаконы CellSeal® (Cook Regentec) и флаконы, описанные в патентах США №№ 8,936,905, US 9,565,854 и 8,709,797, полностью включенных в настоящее описание ссылкой.

В конкретных воплощениях контейнер представляет собой пакет. В некоторых воплощениях контейнер представляет собой пакет с объемом наполнения, равным или около 0,5 мл, 1 мл, 2 мл, 3 мл, 4 мл, 5 мл, 6 мл, 7 мл, 8 мл, 9 мл, 10 мл, 11 мл, 12 мл, 13 мл, 14 мл, 15 мл, 16 мл, 17 мл, 18 мл, 19 мл, 20 мл, 25 мл, 30 мл, 35 мл, 40 мл, 45 мл, или 50 мл. В некоторых воплощениях мешок имеет объем наполнения от 1 до 120 мл, от 1 до 20 мл, от 1 до 5 мл, от 1 до 40 мл, от 20 до 40 мл, от 1 до 70 мл или от 50 мл до 70 мл, в каждом случае включительно. В некоторых воплощениях пакет заполнен объемом, равным или меньшим, чем 100 мл, 75 мл, 70 мл, 50 мл, 25 мл, 20 мл или 10 мл. Подходящие пакеты известны и включают, без ограничения указанным, пакеты для заморозки CryoMacs® (Miltenyi Biotec). В определенных воплощениях объем представляет собой объем при комнатной температуре. В некоторых воплощениях объем представляет собой объем в диапазоне от 37°C до 4°C, от 16°C до 27°C включительно или при, при около или, по меньшей мере, 16°C, 17°C, 18°C, 19°C, 20°C, 21°C, 22°C, 23°C, 24°C, 25°C, 26°C, 27°C, 28°C, 29°C, 30°C, 31°C 32°C, 33°C, 34°C, 35°C, 36°C или 37°C. В некоторых воплощениях объем представляет собой объем при 25°C.

В некоторых воплощениях клетки в объеме среды или раствора, например, замораживающего раствора, от 1 до 20 мл, замораживают в одном или нескольких флаконах включительно. В некоторых воплощениях один или несколько флаконов имеют объем наполнения от 1 до 5 мл включительно. В определенных воплощениях клетки в объеме среды или раствора, например, замораживающего раствора, от 20 до 120 мл включительно, замораживают в одном или нескольких пакетах. В конкретных воплощениях один или несколько пакетов имеют объем наполнения от 20 до 40 мл включительно. В некоторых воплощениях клетки в объеме среды или раствора, например, замораживающего раствора, объемом 120 мл или более, замораживают в одном или нескольких пакетах. В определенных воплощениях один или несколько пакетов имеют объем наполнения от 50 до 70 мл включительно.

В некоторых воплощениях клетки замораживают в растворе, например, в замораживающем растворе, который помещают в контейнер, например, в пакет или флакон, с отношением площади поверхности к объему. В конкретных воплощениях отношение площади поверхности к объему составляет от или от около $0,1 \text{ см}^{-1}$ до 100 см^{-1} ;

от 1 см^{-1} до 50 см^{-1} , от 1 см^{-1} до 20 см^{-1} , от 1 см^{-1} до 10 см^{-1} , от 2 см^{-1} до 10 см^{-1} , от 3 см^{-1} до 7 см^{-1} , или от 3 см^{-1} до 6 см^{-1} , в каждом случае включительно. В конкретных воплощениях отношение площади поверхности к объему составляет или составляет от около 3 см^{-1} до 6 см^{-1} . В некоторых воплощениях отношение площади поверхности к объему составляет, составляет около или составляет, по меньшей мере, 3 см^{-1} , 4 см^{-1} , 5 см^{-1} , 6 см^{-1} или 7 см^{-1} .

В некоторых воплощениях клетки замораживают до -80°C со скоростью около или около 1°C в минуту. В некоторых воплощениях клетки активно и/или эффективно охлаждают со скоростью или около 1°C в минуту, используя морозильник с контролируемой скоростью. В некоторых воплощениях клетки могут быть заморожены с помощью морозильника с контролируемой скоростью. В некоторых аспектах морозильники с контролируемой скоростью используются для замораживания клеток с запрограммированными профилями охлаждения, например, с несколькими скоростями охлаждения и/или нагрева. Такие профили замораживания могут быть запрограммированы для контроля нуклеации, например, образования льда, например, для уменьшения образования внутриклеточного льда. В некоторых воплощениях температура, выбранная для начала профиля быстрого охлаждения, и конечная температура связаны с типами емкостей и объемами замораживания. В некоторых воплощениях, если объемы слишком малы или сосуды имеют слишком высокое отношение площади поверхности к объему, образцы будут слишком быстро реагировать на падение температуры, слишком быстро замерзать и подвергаться риску внутриклеточного образования льда. В других воплощениях, если объемы слишком велики или диаметры сосудов имеют слишком низкое отношение площади поверхности к объему, образцы не будут реагировать на падение температуры, замерзание будет происходить слишком медленно, и образцы подвергаются риску неконтролируемой нуклеации позднее в профиле и повреждению в результате воздействия раствора из-за длительного воздействия криоконсервирующих агентов, например, DMSO, до образования кристаллов льда.

В некоторых воплощениях клетки замораживают с использованием следующего профиля: стадия выдержки при $4,0^{\circ}\text{C}$, а затем стадия охлаждения $1,2^{\circ}\text{C}$ в минуту, пока образец не достигнет температуры -6°C . В некоторых аспектах образец затем охлаждают со скоростью 25°C в минуту, пока камера, содержащая образец, не достигнет -65°C . В некоторых аспектах образец затем нагревают со скоростью 15°C в минуту, пока камера, содержащая образец, не достигнет -30°C . В некоторых аспектах образец затем охлаждают со скоростью 1°C в минуту, пока камера, содержащая образец, не достигнет -40°C . В некоторых аспектах образец затем охлаждают со скоростью 1°C в минуту, пока камера, содержащая образец, не достигнет -90°C . В некоторых аспектах образец затем

выдерживают при -90°C до извлечения из морозильника с контролируемой скоростью.

В некоторых воплощениях клетки замораживают с использованием следующего профиля: стадия выдержки при $4,0^{\circ}\text{C}$, а затем стадия охлаждения $1,2^{\circ}\text{C}$ в минуту, пока образец не достигнет температуры -6°C . В некоторых аспектах образец затем охлаждают со скоростью 25°C в минуту, пока камера, содержащая образец, не достигнет -65°C . В некоторых аспектах образец затем нагревают со скоростью 15°C в минуту, пока камера, содержащая образец, не достигнет -30°C . В некоторых аспектах образец затем охлаждают со скоростью 1°C в минуту, пока камера, содержащая образец, не достигнет -40°C . В некоторых аспектах образец затем охлаждают со скоростью 10°C в минуту, пока камера, содержащая образец, не достигнет -90°C . В некоторых аспектах образец затем выдерживают при -90°C до извлечения из морозильника с контролируемой скоростью.

В некоторых воплощениях клетки охлаждают до температуры выше -80°C до 0°C перед криогенным замораживанием и/или хранением. Например, клетки могут быть охлаждены до -20°C или до температуры выше -80°C или ниже -20°C .

В некоторых воплощениях клетки криогенно замораживают до температуры от -210°C до -80°C перед хранением в криогенных условиях. Например, клетки могут быть криогенно заморожены до -210°C , или -196°C , или -80°C .

В некоторых воплощениях клетки охлаждают и/или криогенно замораживают со скоростью от $0,1$ до 5°C в минуту. В некоторых воплощениях клетки охлаждают и/или криогенно замораживают со скоростью от $0,2$ до 4°C в минуту. В некоторых воплощениях клетки охлаждают и/или криогенно замораживают со скоростью от $0,5$ до 3°C в минуту. В некоторых воплощениях клетки охлаждают и/или криогенно замораживают со скоростью от $0,5$ до 2°C в минуту. В некоторых воплощениях клетки охлаждают и/или криогенно замораживают со скоростью 1°C в минуту. Например, способ охлаждения и/или криогенного замораживания клеток с указанными выше скоростями включает помещение клеток в программируемый холодильник, который понижает их температуру с такими скоростями. Другой способ сделать это включает помещение флакона с клетками в контейнер, в котором флакон окружен изопропиловым спиртом, и помещение контейнера в охлажденную или криогенно замороженную среду. В некоторых воплощениях клетки хранятся при температуре ниже, чем та, до которой они замерзли, используя ступенчатый подход. Например, в некоторых воплощениях хранение осуществляется при температуре ниже -80°C , такой как ниже -100 , -110 , -120 , -130 , -140 , -150 , -160°C или ниже. В некоторых аспектах такое хранение обеспечивает поддержание клеток или их биологической активности в большей степени и/или в течение более длительного периода времени.

В некоторых воплощениях перед охлаждением или криогенным замораживанием клетки промывают для удаления определенных компонентов в образце, в котором находятся клетки. Например, клетки могут быть промыты для удаления плазмы и/или тромбоцитов. Клетки могут быть отмыты, например, как описано в публикации заявки РСТ № WO 2015/164675, полностью включенной в настоящий документ ссылкой.

В некоторых воплощениях клетки объединяют с замораживающим раствором перед охлаждением, криогенным замораживанием и/или криогенным хранением. В некоторых воплощениях среда для замораживания приводит к большему сохранению одной или нескольких биологических функций клеток после охлаждения, криогенного замораживания или криогенного хранения и после оттаивания клеток по сравнению с охлажденными, криогенно замороженными или хранящимися в криогенном состоянии клетками. без замораживания раствора.

В некоторых воплощениях среда для замораживания включает от 0,1 до 50% DMSO по объему и от 0,1 до 20% HSA по массе. В некоторых воплощениях среда для замораживания включает от 0,5 до 40% DMSO по объему и от 0,2 до 15% HSA по массе. В некоторых воплощениях среда для замораживания включает от 1 до 30% DMSO по объему и от 0,5 до 10% HSA по массе. В некоторых воплощениях среда для замораживания включает от 1 до 20% DMSO по объему и от 2 до 7,5% HSA по массе. В некоторых воплощениях среда для замораживания включает от 5 до 20% DMSO по объему и от 1 до 5% HSA по массе. В некоторых воплощениях среда для замораживания включает 10% DMSO по объему или около 7 или 7,5 или 8% DMSO по объему и 4% HSA по массе. В некоторых воплощениях вышеуказанные концентрации представляют собой концентрации DMSO и HSA до объединения замораживающего раствора с клетками. В некоторых воплощениях вышеуказанные концентрации представляют собой концентрации DMSO и HSA после объединения замораживающего раствора с клетками.

В некоторых воплощениях клетки хранят в криогенных условиях при температуре от -210°C до -80°C. В некоторых воплощениях клетки хранят в криогенных условиях при температуре от -210°C до -196°C. В некоторых воплощениях клетки хранят в криогенных условиях при температуре от -196°C до -80°C. В некоторых воплощениях клетки криогенно хранятся в паровой фазе резервуара для хранения жидкого азота.

В некоторых воплощениях клетки хранят в криогенных условиях в течение периода от 1 дня до 12 лет. Например, клетки могут храниться в течение периода, до конца которого они теряют жизнеспособность для применения в клеточной терапии и до тех пор, пока они не потребуются для лечения реципиента. Благодаря тому, что клетки хранятся до тех пор, пока они не потребуются для лечения реципиента, в некоторых

воплощениях раскрытые способы обеспечивают преимущество доступности клеток, когда реципиент нуждается в них для клеточной терапии. В некоторых воплощениях клетки хранятся или хранятся в течение периода времени, превышающего или равного 12 часам, 24 часам, 36 часам или 48 часам. В некоторых воплощениях клетки хранятся или хранятся в течение периода времени, превышающего или равного 1 неделе, 2 неделе, 3 неделе или 4 неделе. В некоторых воплощениях клетки помещаются в «долгосрочное хранение» или «долгосрочное банкирование». В некоторых аспектах клетки хранятся в течение периода времени, большего или равного 1 месяцу, 2 месяцам, 3 месяцам, 4 месяцам, 5 месяцам, 6 месяцам, 7 месяцам, 8 месяцам, 9 месяцам, 10 месяцам, 11 месяцам, 1 году, 2 годам, 3 годам, 4 годам, 5 годам, 6 годам, 7 годам, 8 годам, 9 годам, 10 годам, 11 годам, 12 годам, 13 годам, 14 годам, 15 годам, 16 годам, 17 годам, 18 годам, 19 годам, 20 годам, 25 годам, 30 годам, 35 годам, 40 годам или более.

В некоторых воплощениях после периода хранения клетки оттаивают. В некоторых воплощениях клетки оттаивают путем повышения температуры клеток до или выше 0°C, чтобы восстановить, по меньшей мере, часть биологической функции клеток. В некоторых воплощениях клетки оттаивают путем повышения температуры клеток до 37°C, чтобы восстановить, по меньшей мере, часть биологической функции клеток. В соответствии с некоторыми воплощениями оттаивание включает помещение клеток в контейнере в водяную баню при 37°C на 60-90 секунд.

В некоторых воплощениях клетки оттаивают. В конкретных воплощениях клетки оттаивают быстро, например, настолько быстро, насколько это возможно, без перегрева клеток или воздействия на клетки высоких температур, таких как температуры выше 37°C. В некоторых воплощениях быстрое оттаивание уменьшает и/или предотвращает воздействие на клетки высоких концентраций криопротектора и/или DMSO. В конкретных воплощениях на скорость, с которой происходит оттаивание, могут влиять свойства контейнера, например, флакона и/или пакета, в котором клетки замораживаются и оттаивают.

В конкретных воплощениях клетки оттаивают при температуре около или менее 37°C, 35°C, 32°C, 30°C, 29°C, 28°C, 27°C, 26°C, 25°C, 24°C, 23°C, 22°C, 21°C, 20°C или 15°C, или от 15°C до 30°C, от 23°C до 28°C, или от 24°C до 26°C, в каждом случае включительно.

В некоторых воплощениях клетки оттаивают на тепловом блоке, в сухом оттаивателе или на водяной бане. В некоторых воплощениях клетки не оттаивают на тепловом блоке, в сухом оттаивателе или водяной бане. В некоторых воплощениях клетки оттаивают при комнатной температуре.

В некоторых воплощениях толщина стенок контейнера влияет на скорость оттаивания клеток, например, клетки в контейнерах с толстыми стенками могут оттаивать с меньшей скоростью, чем в контейнерах с более тонкими стенками. В некоторых воплощениях контейнеры, имеющие низкое отношение площади поверхности к объему, могут иметь медленную и/или неравномерную скорость оттаивания. В некоторых воплощениях криозамороженные клетки быстро оттаивают в контейнере, имеющем отношение площади поверхности к объему, равное или близкое, по меньшей мере, 1 см^{-1} , 2 см^{-1} , 3 см^{-1} , 4 см^{-1} , 5 см^{-1} , 6 см^{-1} или 7 см^{-1} , 8 см^{-1} , 9 см^{-1} или 10 см^{-1} . В конкретных воплощениях клетки размораживают около за 120 минут, 90 минут, 60 минут, 45 минут, 30 минут, 25 минут, 20 минут, 15 минут или десять минут или менее чем за 120 минут. В некоторых воплощениях клетки оттаивают в течение от 10 минут до 60 минут, от 15 минут до 45 минут или от 15 минут до 25 минут, в каждом случае включительно. В конкретных воплощениях клетки оттаивают через, около или менее чем за 20 минут.

В некоторых воплощениях оттаявшие клетки покоятся, например, инкубируются или культивируются, до введения или перед любыми последующими стадиями инжиниринга и/или обработки. В некоторых воплощениях клетки покоятся в низких и/или неопределяемых количествах криопротектора или в отсутствие криопротектора, например, DMSO. В конкретных воплощениях оттаявшие клетки оставляют в покое после или сразу после стадий промывки, например, для удаления криопротектора и/или DMSO. В некоторых воплощениях покой является или включает культивирование и/или инкубацию при или около 37°C . В некоторых воплощениях в покое оставляют в отсутствие каких-либо реагентов, например, стимулирующих реагентов, реагентов для шариков или рекомбинантных цитокинов, используемых с и/или связанных с какой-либо стадией процессирования или инжиниринга. В некоторых воплощениях клетки оставляют в покое в течение около или в течение, по меньшей мере, 5 минут, 10 минут, 15 минут, 30 минут, 1 часа, 2 часов, 3 часов, 4 часов, 5 часов, 6 часов, 8 часов, 12 часов, 18 часов или 24 часов. В некоторых воплощениях клетки оставляют в покое в течение около или в течение, по меньшей мере, 2 часов.

В некоторых воплощениях после периода хранения процент жизнеспособных клеток составляет от 24% до 100%. Процент жизнеспособных клеток может быть определен, например, с помощью метода исключения красителя трипановым синим, например, как описано в Schulz et al., *Towards a xeno-free and fully chemically defined cryopreservation medium for maintaining viability, recovery, and antigen-specific functionality of PBMC during long-term storage*, 382 J. Immu. Methods 24, 26, в которых описано выполнение исключения трипанового синего с использованием анализатора

жизнеспособности клеток ViCell™ (Beckman Coulter, Крефельд, Германия). Например, при методе исключения красителя трипанового синего мертвые клетки выглядят голубыми и поэтому их можно отличить от жизнеспособных клеток. Процент жизнеспособных клеток также может быть определен, например, с помощью проточного цитометра или другого метода или инструмента.

Во время процесса охлаждения, криогенного замораживания и/или криогенного хранения образца или клеток сохраняется одна или несколько биологических функций клеток. Использование замораживающего раствора способствует сохранению этих биологических функций. Когда клетки оттаивают, эти биологические функции восстанавливаются. В дополнение к жизнеспособности, биологической функции, описанной выше, другие биологические функции могут включать способность клеток к репликации, восприимчивость к генетической модификации и способность помогать в иммунологических процессах, включая созревание В-клеток в плазматические клетки и/или В-клетки памяти и активацию цитотоксических Т-клеток и/или макрофагов и т.д.

В некоторых воплощениях признаки замороженных клеток, включая любые клетки и композиции, как описано, такие как клеточные композиции с определенной концентрацией или плотностью клеток, заморожены в присутствии криопротектора и/или помещены в контейнер с определенным объемом или отношение поверхности к объему включает улучшенную, увеличенную и/или более быструю экспансию; улучшенную, увеличенную и/или повышенную выживаемость клеток и уменьшение случаев смерти клеток, например, некроза, запрограммированной гибели клеток и/или апоптоза; улучшенная, усиленная и/или повышенная активность, например, цитолитическая активность; и/или уменьшенная причина старения или покоя после оттаивания, чем у клеток, замороженных альтернативными способами.

В конкретных воплощениях клетки замораживаются при плотности клеток и/или соотношении площади поверхности к объему, представленному в настоящем документе, и имеют пониженную гибель клеток, например, некроз и/или апоптоз, во время и/или в результате замораживания, криозамораживания и/или криоконсервации по сравнению с клетками, замороженными с другой плотностью клеток и/или с другим отношением площади поверхности к объему в тех же или подобных условиях. В конкретных воплощениях клетки замораживают при плотности клеток и/или соотношении площади поверхности к объему, представленному в данном документе, и имеют уменьшенную задержку гибели клеток, например, уменьшение количества клеток, которые погибают, например, из-за некроза, запрограммированной гибели клеток или апоптоза в течение 48 часов после замораживания, криозамораживания и/или криоконсервации, например, после

оттаивания замороженных клеток. В некоторых воплощениях, по меньшей мере, или около на 5%, 10%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или 99% меньше клеток погибает во время и/или в результате замораживания и/или криоконсервации по сравнению с клетками, которые заморожены при другой плотности клеток и/или при различном соотношении площади поверхности к объему в тех же или подобных условиях. В некоторых воплощениях менее 40%, 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, 5%, 1%, 0,1% или 0,01% клеток заморожены при заданной плотности клеток и/или отношение площади поверхности к объему умирает во время или в результате замораживания, криозамораживания и/или криоконсервации.

В некоторых воплощениях клетки замораживаются при плотности клеток и/или соотношении площади поверхности к объему, представленному в данном документе, и имеют уменьшенные случаи старения или покоя из-за и/или в результате замораживания, криозамораживания и/или криоконсервации по сравнению с клетками, замороженными с другой плотностью клеток и/или другим отношением площади поверхности к объему в тех же или аналогичных условиях. В конкретных воплощениях, по меньшей мере, или около на 5%, 10%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или 99% меньше клеток являются стареющими и/или покоящимися клетки по сравнению с клетками, замороженными с другой плотностью клеток и/или другим отношением площади поверхности к объему в тех же или аналогичных условиях. В некоторых воплощениях клетки замораживают при предоставленном отношении плотности клеток и/или площади поверхности к объему и менее чем 40%, 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, 5%, 1%, 0,1% или 0,01% клеток становятся стареющими и/или неподвижными в результате замораживания, криозамораживания и/или криоконсервации.

В некоторых воплощениях клетки замораживаются, например, криозамораживаются, при плотности клеток и/или соотношении площади поверхности к объему, представленному в данном документе, и имеют улучшенное, ускоренное и/или более быстрое размножение, например, в стимулирующих условиях, таких как инкубация со стимулирующим реагентом, описанная в данном документе, после размораживания клеток по сравнению с клетками, замороженными при другой плотности клеток и/или соотношении площади поверхности к объему в тех же или аналогичных условиях. В конкретных воплощениях клетки размножаются со скоростью, которая является ускоренной и/или более быстрой, примерно, или, по меньшей мере, на 5%, 10%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 150%, 200%, 1-кратно, 1,5-кратно, 2-кратно, 3-кратно, 4-кратно, 5-кратный кратно или 10-кратно по сравнению с клетками, замороженными с другой плотностью клеток и/или другим отношением площади

поверхности к объему в тех же или аналогичных условиях. Например, в некоторых воплощениях оттаявшие клетки достигают порогового размножения, например, заранее определенного числа клеток, плотности или фактора, такого как 2-кратное размножение, за период времени примерно, или около меньший на 5%, 10%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% или 99%, чем у оттаявших клеток, которые были заморожены при другой плотности клеток и/или другом отношении площади поверхности к объему в тех же или аналогичных условиях.

В некоторых воплощениях клетки замораживаются, например, криозамораживаются, при плотности клеток и имеют улучшенную, повышенную и/или большую цитолитическую активность, например, такую как измеренная любым анализом для измерения цитолитической активности, описанной в данном документе, после оттаивания клеток, по сравнению с клетками, замороженными при другой плотности клеток, например, при более высокой или более низкой плотности, в тех же или аналогичных условиях. В конкретных воплощениях цитолитическая активность увеличивается на около или, по меньшей мере, на 5%, 10%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 150%, 200%, 1-кратно, 1,5-кратно, 2-кратно, 3-кратно, 4-кратно, 5-кратно или 10-кратно по сравнению с клетками, замороженными с другой плотностью при тех же или аналогичных условиях.

Клеточные модификации

В некоторых воплощениях клетки могут быть модифицированы, например, для придания клеткам одной или нескольких из новой, улучшенной, измененной, повышенной или пониженной активности. В некоторых воплощениях клетки модифицируют после сбора и перед криогенным замораживанием и/или хранением. В некоторых воплощениях клетки модифицируют после оттаивания после криогенного хранения. Типичные способы модификации клеток описаны в публикациях заявок РСТ № WO 2016/033570 и WO 2016/115559, полностью включенных в настоящий документ ссылкой. Типичные способы модификации клеток также описаны в WO2017214207 и/или WO2016073602, содержание которых полностью включено в настоящее описание ссылкой.

В некоторых воплощениях активность представляет собой биологическую функцию клеток, такую как, например, способность клеток оказывать помощь в иммунологических процессах, включая созревание В-клеток в плазматические клетки и/или В-клетки памяти и активацию цитотоксических Т-клеток и/или макрофагов и т.д. В некоторых воплощениях активность представляет собой способность клеток связываться со специфическими лигандами или антигенами с использованием рецепторов, рецептор-подобных молекул, антител или антителоподобных молекул. В некоторых воплощениях

активность представляет собой способность клеток распознавать и уничтожать инфицированные вирусом клетки и опухолевые клетки.

Генетическая модификация клеток

В некоторых воплощениях модификация клеток включает генетическую модификацию клеток. Например, генетическая модификация может быть такой, как описано в публикациях заявок РСТ № WO 2016/033570 и WO 2016/115559, полностью включенных в настоящий документ. Типичные способы генетической модификации также описаны в WO2017214207 и/или WO2016073602, содержание которых полностью включено в настоящее описание ссылкой.

В некоторых воплощениях генетическая модификация включает генетическую модификацию клеток таким образом, который позволяет клеткам экспрессировать химерную молекулу, содержащую одноцепочечный вариабельный фрагмент («scFv»), для распознавания белка. В некоторых воплощениях scFv связывается с конкретным белком. В некоторых воплощениях scFv происходит из части антитела, которая связывается с конкретным белком. В некоторых воплощениях, когда scFv экспрессируется клетками, клетки способны распознавать злокачественные опухолевые клетки и активировать себя. В некоторых воплощениях scFv связывает, по меньшей мере, один из числа рецептора орфанной тирозинкиназы ROR1, tEGFR, Her2, L1-CAM, CD19, CD20, CD22, мезотелина, CEA и поверхностного антигена гепатита В, анти-фолатного рецептора, CD23, CD24, CD30, CD33, CD38, CD44, EGFR, EGP-2, EGP-4, EPHa2, ErbB2, 3 или 4, FBP, фетального ацетилхолинового рецептора, GD2, GD3, HMW-MAA, IL-22R-альфа, IL-13R-альфа2, kdr, каппа легкой цепи, Lewis Y, молекулы адгезии клеток L1, MAGE-A1, мезотелина, MUC1, MUC16, BCMA, IL-13Ra2, FCRL5/FCRH5, GPRC5D, PSCA, лигандов NKG2D, NY-ESO-1, MART-1, gp100, онкофетального антигена, ROR1, TAG72, VEGF-R2, карциноэмбрионального антигена (CEA), простат-специфического антигена, PSMA, Her2/neu, рецептора эстрогена, рецептора прогестерона, эфрина B2, CD123, CS-1, c- Met, GD-2 и MAGE A3, CE7, белка опухоли Вильмса 1 (WT-1), циклина, такого как циклин A1 (CCNA1), и/или биотинилированных молекул, и/или молекул, экспрессируемых HIV, HCV, HBV или другими патогенами. В некоторых воплощениях scFv связывает CD19. В некоторых воплощениях scFv связывает BCMA.

CAR

В некоторых воплощениях генетическая модификация включает генетическую модификацию клеток для экспрессии одного или нескольких химерных антигенных рецепторов (CAR). Типичные антигенные рецепторы, включая CAR, и способы конструирования и введения таких рецепторов в клетки включают те, которые описаны,

например, в публикациях патентных заявок PCT WO 2000/14257, WO 2013/126726, WO 2012/129514, WO 2014/031687, WO 2013/166321, WO 2013/071154, WO 2013/123061 публикациях патентных заявок США № 2002/131960, 2013/287748, 2013/0149337, патентах США №: 6,451,995, 7,446,190, 8,252,592, 8,339,645, 8,398,282, 7,446,179, 6,410,319, 7,070,995, 7,265,209, 7,354,762, 7,446,191, 8,324,353 и 8,479,118, а также европейском патенте № EP 2537416 и/или те, которые описаны в Sadelain et al., *Cancer Discov.*, 3 (4): 388–398 (2013); Davila et al. *PLoS ONE* 8(4): e61338 (2013); Turtle et al., *Curr. Opin. Immunol.*, 24(5): 633–39 (2012); Wu et al., *Cancer*, 18(2): 160–75 (2012). В некоторых аспектах антигенные рецепторы включают CAR, описанные в патенте США № 7,446,190, и рецепторы, описанные в публикации патентной заявки PCT № WO 2014/055668 A1. Примеры CAR включают CAR, описанные в любой из вышеупомянутых публикаций, таких как WO 2014/031687, US 8,339,645, US 7,446,179, US 2013/0149337, US 7,446,190, US 8,389,282, Kochenderfer et al., *Nature Reviews Clinical Oncology*, 10 267–276 (2013); Wang et al., *J. Immunother.* 35 (9): 689–701 (2012); и Brentjens et al., *Sci Transl Med.*, 5 (177) (2013). См. также WO 2014/031687, US 8,339,645, US 7,446,179, US 2013/0149337, US 7,446,190 и US 8,389,282. Химерные рецепторы, такие как CAR, обычно включают внеклеточный антигенсвязывающий домен, такой как часть молекулы антитела, обычно область вариабельной тяжелой (VH) цепи и/или области вариабельной легкой (VL) цепи антитела, например, антительного фрагмента scFv. В некоторых воплощениях химерные рецепторы включают внеклеточный антигенсвязывающий домен, который не происходит из молекулы антитела, такой как лиганд или другой связывающий фрагмент.

В некоторых воплощениях антиген, на который направлен рецептор, представляет собой полипептид. В некоторых воплощениях это углевод или другая молекула. В некоторых воплощениях антиген избирательно экспрессируется или сверхэкспрессируется на клетках заболевания или состояния, например, опухолевых или патогенных клетках, по сравнению с нормальными или нецелевыми клетками или тканями. В других воплощениях антиген экспрессируется на нормальных клетках и/или экспрессируется на сконструированных клетках.

Антигены, на которые нацелены рецепторы, в некоторых воплощениях включают рецептор орфанной тирозинкиназы ROR1, tEGFR, Her2, L1-CAM, CD19, CD20, CD22, мезотелин, CEA и поверхностный антиген гепатита В, антифолатный рецептор, CD23, CD24, CD30, CD33, CD38, CD44, EGFR, EGP-2, EGP-4, EphA2, ErbB2, 3 или 4, FBP, фетальный ацетилхолиновый рецептор, GD2, GD3, HMW-MAA, IL-22R-альфа, IL-13R-альфа2, kdr, каппа легкой цепи, Lewis Y, молекулу адгезии клеток L1, MAGE-A1, мезотелин, MUC1, MUC16, PSCA, лиганды NKG2D, NY-ESO-1, MART-1, gp100,

онкофетальный антиген, ROR1, TAG72, VEGF-R2, карциноэмбриональный антиген (CEA), простат-специфический антиген, PSMA, Her2/neu, рецептор эстрогена, рецептор прогестерона, ephrinB2, CD123, c-Met, GD-2 и MAGE A3, CE7, белок опухоли Вильмса 1 (WT- 1) циклин, такой как циклин A1 (CCNA1), и/или биотинилированные молекулы, и/или молекулы, экспрессируемые HIV, HCV, HBV или другими патогенами.

В некоторых воплощениях CAR связывает патоген-специфический антиген. В некоторых воплощениях CAR является специфичным для вирусных антигенов (таких как HIV, HCV, HBV и т.д.), бактериальных антигенов и/или паразитарных антигенов.

В некоторых воплощениях часть антитела рекомбинантного рецептора, например, CAR, дополнительно включает, по меньшей мере, часть константной области иммуноглобулина, такую как шарнирная область, например, шарнирная область IgG4, и/или область CH1/CL и/или Fc. В некоторых воплощениях константная область или часть принадлежит к человеческому IgG, такому как IgG4 или IgG1. В некоторых аспектах часть константной области служит спейсерной областью между антиген-распознающим компонентом, например, scFv, и трансмембранным доменом. Спейсер может иметь длину, которая обеспечивает повышенную чувствительность клетки после связывания антигена по сравнению с отсутствием спейсера. Примерные спейсеры, например, шарнирные области, включают те, которые описаны в публикации международной патентной заявки № WO 2014/031687. В некоторых примерах спейсер имеет длину или составляет около 12 аминокислот или имеет длину не более 12 аминокислот. Типичные спейсеры включают те, которые имеют, по меньшей мере, от около 10 до 229 аминокислот, от около 10 до 200 аминокислот, от около 10 до 175 аминокислот, от около 10 до 150 аминокислот, от около 10 до 125 аминокислот, от около 10 до 100 аминокислот, от около 10 до 75 аминокислот, от 10 до 50 аминокислот, от 10 до 40 аминокислот, от 10 до 30 аминокислот, от 10 до 20 аминокислот или от 10 до 15 аминокислот, и включая любое целое число между конечными точками любого из перечисленных диапазонов. В некоторых воплощениях спейсерная область содержит около 12 аминокислот или менее, около 119 аминокислот или менее или около 229 аминокислот или менее. Типичные спейсеры включают только шарнир IgG4, шарнир IgG4, связанный с доменами CH2 и CH3, или шарнир IgG4, связанный с доменом CH3. Типичные спейсеры включают, без ограничения указанным, те, что описаны в Hudecek et al. Clin. Cancer Res., 19: 3153 (2013), публикации международной патентной заявки № WO2014031687, патенте США № 8,822,647 или публикации патентной заявки США № 2014/0271635.

В некоторых воплощениях константная область или часть принадлежит к человеческому IgG, такому как IgG4 или IgG1. В некоторых воплощениях спейсер имеет

последовательность ESKYGPPCPPCP. В некоторых воплощениях константная область или часть имеет IgD.

Домен распознавания антигена обычно связан с одним или несколькими внутриклеточными сигнальными компонентами, такими как сигнальные компоненты, которые имитируют активацию через комплекс антигенного рецептора, такого как комплекс TCR, в случае CAR, и/или сигнал через другой рецептор клеточной поверхности. Таким образом, в некоторых воплощениях антигенсвязывающий компонент (например, антитело) связан с одним или несколькими трансмембранными и внутриклеточными сигнальными доменами. В некоторых воплощениях трансмембранный домен слит с внеклеточным доменом. В одном воплощении используется трансмембранный домен, который естественным образом связан с одним из доменов в рецепторе, например, CAR. В некоторых случаях трансмембранный домен выбирают или модифицируют путем замены аминокислот, чтобы избежать связывания таких доменов с трансмембранными доменами одного и того же или разных белков поверхностной мембраны, чтобы минимизировать взаимодействия с другими членами рецепторного комплекса.

Трансмембранный домен в некоторых воплощениях происходит либо из природного, либо из синтетического источника. Если источник является природным, домен в некоторых аспектах происходит от любого мембраносвязанного или трансмембранного белка. Трансмембранные области включают области, полученные из (то есть включают, по меньшей мере, трансмембранную(ые) область(и)) альфа-, бета- или дзета-цепи рецептора Т-клеток, CD28, CD3-эпсилон, CD45, CD4, CD5, CD8, CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137, CD154. В иных случаях, трансмембранный домен в некоторых воплощениях является синтетическим. В некоторых аспектах синтетический трансмембранный домен содержит преимущественно гидрофобные остатки, такие как лейцин и валин. В некоторых аспектах триплет фенилаланина, триптофана и валина будет обнаружен на каждом конце синтетического трансмембранного домена. В некоторых воплощениях связь осуществляется линкерами, спейсерами и/или трансмембранным(ыми) доменом(ами).

К внутриклеточным сигнальным доменам относятся те, которые имитируют или аппроксимируют сигнал через рецептор природного антигена, сигнал через такой рецептор в сочетании с костимулирующим рецептором и/или сигнал только через один костимулирующий рецептор. В некоторых воплощениях присутствует короткий олиго- или полипептидный линкер, например, линкер длиной от 2 до 10 аминокислот, такой как линкер, содержащий глицины и серины, например, глицин-сериновый дублет, и

образующий связь между трансмембранным доменом и цитоплазматическим сигнальным доменом CAR.

Рецептор, например, CAR, обычно включает, по меньшей мере, один внутриклеточный сигнальный компонент или компоненты. В некоторых воплощениях рецептор включает внутриклеточный компонент комплекса TCR, такой как цепь CD3 TCR, которая опосредует активацию Т-клеток и цитотоксичность, например, дзета-цепь CD3. Таким образом, в некоторых аспектах антигенсвязывающая часть связана с одним или несколькими клеточными сигнальными модулями. В некоторых воплощениях модули клеточной сигнализации включают трансмембранный домен CD3, внутриклеточные сигнальные домены CD3 и/или другие трансмембранные домены CD. В некоторых воплощениях рецептор, например, CAR, дополнительно включает часть одной или нескольких дополнительных молекул, таких как Fc-рецептор γ , CD8, CD4, CD25 или CD16. Например, в некоторых аспектах CAR или другой химерный рецептор включает химерную молекулу между CD3-дзета (CD3- ζ) или Fc-рецептором γ и CD8, CD4, CD25 или CD16.

В некоторых воплощениях после лигирования CAR или другого химерного рецептора цитоплазматический домен или внутриклеточный сигнальный домен рецептора активирует, по меньшей мере, одну из нормальных эффекторных функций или ответов иммунной клетки, например, Т-клетки, сконструированной для экспрессии CAR. Например, в некоторых контекстах CAR индуцирует функцию Т-клетки, такую как цитолитическая активность или активность Т-хелпера, такую как секреция цитокинов или другие факторы. В некоторых воплощениях вместо интактной иммуностимулирующей цепи используется, например, усеченная часть внутриклеточного сигнального домена антигенного рецепторного компонента или костимулирующей молекулы, если она передает сигнал эффекторной функции. В некоторых воплощениях внутриклеточный сигнальный домен или домены включают цитоплазматические последовательности рецептора Т-клеток (TCR), а в некоторых аспектах также последовательности корецепторов, которые в естественном контексте действуют совместно с такими рецепторами, инициируя трансдукцию сигнала после взаимодействия с антигенным рецептором.

В контексте естественного TCR для полной активации обычно требуется не только передача сигналов через TCR, но и костимулирующий сигнал. Таким образом, в некоторых воплощениях, чтобы способствовать полной активации, компонент для генерации вторичного или костимулирующего сигнала также включен в CAR. В других воплощениях CAR не включает компонент для генерации костимулирующего сигнала. В

некоторых аспектах дополнительный CAR экспрессируется в той же клетке и обеспечивает компонент для генерации вторичного или костимулирующего сигнала.

Т-клеточная активация в некоторых аспектах описывается как опосредуемая двумя классами цитоплазматических сигнальных последовательностей: теми, которые инициируют антиген-зависимую первичную активацию через TCR (первичные цитоплазматические сигнальные последовательности), и теми, которые действуют антиген-независимым образом, чтобы обеспечить вторичный или костимулирующий сигнал (вторичные цитоплазматические сигнальные последовательности). В некоторых аспектах CAR включает один или оба из таких сигнальных компонентов.

В некоторых аспектах CAR включает первичную цитоплазматическую сигнальную последовательность, которая регулирует первичную активацию комплекса TCR. Первичные цитоплазматические сигнальные последовательности, которые действуют стимулирующим образом, могут содержать сигнальные мотивы, известные как иммунорецепторные мотивы активации на основе тирозина или ITAM. Примеры ITAM, содержащих первичные цитоплазматические сигнальные последовательности, включают последовательности, происходящие из цепи CD3-дзета, FcR-гамма, CD3-гамма, CD3-дельта и CD3-эпсилон. В некоторых воплощениях цитоплазматическая сигнальная молекула (молекулы) в CAR содержит(ат) цитоплазматический сигнальный домен, его часть или последовательность, происходящую из CD3-дзета.

В некоторых воплощениях CAR включает сигнальный домен и/или трансмембранную часть костимулирующего рецептора, такой как CD28, 4-1BB, OX40, DAP10 и ICOS. В некоторых аспектах один и тот же CAR включает как активирующий, так и костимулирующий компоненты.

В некоторых воплощениях активирующий домен включен в один CAR, тогда как костимулирующий компонент обеспечивается другим CAR, распознающим другой антиген. В некоторых воплощениях CAR включают активирующие или стимулирующие CAR, костимулирующие CAR, оба экспрессируемые в одной и той же клетке (см. WO2014/055668). В некоторых аспектах клетки включают один или несколько стимулирующих или активирующих CAR и/или костимулирующий CAR. В некоторых воплощениях клетки дополнительно включают ингибиторные CAR (iCAR, см. Fedorov et al., *Sci. Transl. Medicine*, 5 (215) (2013)), такие как CAR, распознающие антиген, отличный от антигена, ассоциированного и/или специфичного для заболевания или состояния, посредством которого активирующий сигнал, доставляемый через CAR, нацеленный на заболевание, уменьшается или ингибируется связыванием ингибирующего CAR к его лиганду, например, для уменьшения нецелевых эффектов.

В некоторых воплощениях внутриклеточный сигнальный домен содержит трансмембранный CD28 и сигнальный домен, связанный с внутриклеточным доменом CD3 (например, CD3-дзета). В некоторых воплощениях внутриклеточный сигнальный домен включает химерные домены стимуляции CD28 и CD137 (4-1BB, TNFRSF9), связанные с внутриклеточным доменом CD3-дзета.

В некоторых воплощениях CAR включает один или несколько, например, два или более костимулирующих домена и домен активации, например, домен первичной активации, в цитоплазматической части. Типичные CAR включают внутриклеточные компоненты CD3-дзета, CD28 и 4-1BB.

В некоторых воплощениях CAR или другой антигенный рецептор дополнительно включает маркер, такой как маркер клеточной поверхности, который может использоваться для подтверждения трансдукции или инженерии клетки для экспрессии рецептора, такой как усеченная версия рецептора клеточной поверхности, такой как усеченный EGFR (tEGFR). В некоторых аспектах маркер включает полностью или частично (например, усеченную форму) PSMA, Her2, CD34, NGFR или рецептора эпидермального фактора роста (например, tEGFR). В некоторых воплощениях нуклеиновая кислота, кодирующая маркер, функционально связана с полинуклеотидом, кодирующим последовательность линкера, такую как последовательность расщепляемого линкера, например, T2A. Например, маркер и, необязательно, последовательность линкера могут быть любыми, как описано в публикации патентной заявки PCT № WO 2014 031687, которая включена в настоящий документ ссылкой. В некоторых воплощениях маркер может быть таким, как описано в публикации патентной заявки PCT № WO 2011/056894, содержание которой включено полностью. Например, маркер может представлять собой усеченный EGFR (tEGFR), который, необязательно, связан с последовательностью линкера, такой как расщепляемая последовательность линкера T2A.

В некоторых воплощениях маркер представляет собой молекулу, например, белок клеточной поверхности, который не обнаружен в природе в Т-клетках или не обнаружен в естественных условиях на поверхности Т-клеток, или представляет собой его часть. В некоторых воплощениях молекула представляет собой несобственную молекулу, например, несобственный белок, то есть ту, которая не распознается как «собственная» иммунной системой хозяина, в которую клетки будут адоптивно перенесены.

В некоторых воплощениях маркер не выполняет терапевтической функции и/или не производит никакого эффекта, кроме как для применения в качестве маркера для генной инженерии, например, для отбора успешно сконструированных клеток. В других воплощениях маркер может представлять собой терапевтическую молекулу или молекулу,

иным образом оказывающую некоторый желаемый эффект, такой как лиганд для клетки, встречающейся *in vivo*, такой как молекула костимулирующая молекула или молекула иммунного чекпойнта, для усиления и/или ослабления ответов клеток при адоптивной передаче и встрече с лигандом.

В некоторых случаях CAR называются CAR первого, второго и/или третьего поколения. В некоторых аспектах CAR первого поколения представляет собой тот, который обеспечивает только сигнал, индуцированный CD3-цепью, при связывании антигена; в некоторых аспектах CAR второго поколения представляют собой такой, который обеспечивает такой сигнал и костимулирующий сигнал, например, такой, который включает внутриклеточный сигнальный домен от костимулирующего рецептора, такого как CD28 или CD137; в некоторых аспектах CAR третьего поколения представляет собой тот, который включает множество костимулирующих доменов различных костимулирующих рецепторов.

В некоторых воплощениях химерный антигенный рецептор включает внеклеточную часть, содержащую антитело или фрагмент антитела. В некоторых аспектах химерный антигенный рецептор включает внеклеточную часть, содержащую антитело или фрагмент и внутриклеточный сигнальный домен. В некоторых воплощениях антитело или его фрагмент включает scFv, а внутриклеточный домен содержит ITAM. В некоторых аспектах внутриклеточный сигнальный домен включает сигнальный домен дзета-цепи CD3-дзета (CD3 ζ) цепи. В некоторых воплощениях химерный антигенный рецептор включает трансмембранный домен, связывающий внеклеточный домен и внутриклеточный сигнальный домен. В некоторых аспектах трансмембранный домен содержит трансмембранную часть CD28. В некоторых воплощениях химерный антигенный рецептор содержит внутриклеточный домен костимулирующей молекулы Т-клеток. Внеклеточный домен и трансмембранный домен могут быть связаны прямо или косвенно. В некоторых воплощениях внеклеточный домен и трансмембранный домен связаны спейсером, таким как любой описанный в данном документе. В некоторых воплощениях рецептор содержит внеклеточную часть молекулы, из которой происходит трансмембранный домен, такую как внеклеточная часть CD28. В некоторых воплощениях химерный антигенный рецептор содержит внутриклеточный домен, полученный из костимулирующей молекулы Т-клеток или ее функционального варианта, например, между трансмембранным доменом и внутриклеточным сигнальным доменом. В некоторых аспектах костимулирующей молекулой Т-клеток является CD28 или 41BB.

Например, в некоторых воплощениях CAR содержит антитело, например, фрагмент антитела, трансмембранный домен, который является или содержит

трансмембранную часть CD28 или его функционального варианта, и внутриклеточный сигнальный домен, содержащий сигнальную часть CD28 или функциональную его вариант и сигнальная часть CD3-дзета или его функциональный вариант. В некоторых воплощениях CAR содержит антитело, например, фрагмент антитела, трансмембранный домен, который является или содержит трансмембранную часть CD28 или его функциональный вариант, и внутриклеточный сигнальный домен, содержащий сигнальную часть 4-1BB или функциональный вариант и сигнальная часть CD3-дзета или его функциональный вариант. В некоторых таких воплощениях рецептор дополнительно включает спейсер, содержащий часть молекулы Ig, такую как молекула Ig человека, такую как шарнир Ig, например, шарнир IgG4, такую как спейсер только для шарнира.

В некоторых воплощениях трансмембранный домен рекомбинантного рецептора, например, CAR, представляет собой или включает трансмембранный домен человеческого CD28 (например, учетный номер P01747.1) или его вариант.

В некоторых воплощениях внутриклеточный сигнальный компонент(ы) рекомбинантного рецептора, например, CAR, содержит внутриклеточный костимулирующий сигнальный домен CD28 человека или его функциональный вариант или часть, такую как домен с заменой LL на GG в положениях 186 -187 нативного белка CD28. В некоторых воплощениях внутриклеточный домен содержит внутриклеточный костимулирующий сигнальный домен 4-1BB (например, учетный номер Q07011.1) или его функциональный вариант или его часть.

В некоторых воплощениях внутриклеточный сигнальный домен рекомбинантного рецептора, например, CAR, содержит дзета-стимулирующий сигнальный домен CD3 человека или его функциональный вариант, такой как цитоплазматический домен 112 AA изоформы 3 CD3 ζ человека (номер доступа: P20963. 2) или сигнальный домен CD3- дзета, описанный в патенте США № 7,446,190 или патенте США № 8,911,993.

В некоторых аспектах спейсер содержит только шарнирную область IgG, такую как только шарнирную часть IgG4 или IgG1. В других воплощениях спейсер представляет собой или содержит шарнир Ig, например, шарнир, полученный из IgG4, необязательно связанный с доменами CH2 и/или CH3. В некоторых воплощениях спейсер представляет собой шарнир Ig, например, шарнир IgG4, связанный с доменами CH2 и CH3. В некоторых воплощениях спейсер представляет собой шарнир Ig, например, шарнир IgG4, связанный только с доменом CH3. В некоторых воплощениях спейсер представляет собой или содержит последовательность, богатую глицином-серином, или другой гибкий линкер, такой как известные гибкие линкеры.

Например, в некоторых воплощениях CAR включает антитело, такое как фрагмент

антитела, включая scFv, спейсер, такой как спейсер, содержащий часть молекулы иммуноглобулина, такой как шарнирная область и/или одна или несколько константных областей молекулы тяжелой цепи, такой как спейсер, содержащий Ig-шарнир, трансмембранный домен, содержащий весь или часть трансмембранного домена, происходящего из CD28, внутриклеточный сигнальный домен, происходящий из CD28, и сигнальный домен CD3-дзета. В некоторых воплощениях CAR включает антитело или фрагмент, такой как scFv, спейсер, такой как любой из спейсеров, содержащих Ig-шарнир, трансмембранный домен, полученный из CD28, внутриклеточный сигнальный домен, полученный из 4-1BB, и домен передачи сигналов из CD3-дзета.

В некоторых воплощениях молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие такие конструкции CAR, дополнительно включают последовательность, кодирующую элемент ухода с рибосомы T2A и/или последовательность tEGFR, например, ниже последовательности, кодирующей CAR. В некоторых воплощениях Т-клетки, экспрессирующие рецептор антигена (например, CAR), также могут быть получены для экспрессии усеченного EGFR (EGFRt) в качестве неиммуногенного селективного эпитопа (например, путем введения конструкции, кодирующей CAR и EGFRt, разделенной рибосомным свитчем T2A для экспрессии двух белков из одной и той же конструкции), которые затем можно использовать в качестве маркера для обнаружения таких клеток (см., например, патент США № 8,802,374).

Рекомбинантные рецепторы, такие как CAR, экспрессируемые клетками, вводимыми объекту, обычно распознают или специфически связываются с молекулой, которая экспрессируется, ассоциируется и/или специфична для заболевания или состояния или его клеток, подвергаемых лечению. При специфическом связывании с молекулой, например, антигеном, рецептор обычно доставляет иммуностимулирующий сигнал, такой как сигнал, трансформированный ИТАМ, в клетку, тем самым стимулируя иммунный ответ, направленный на заболевание или состояние. Например, в некоторых воплощениях клетки экспрессируют CAR, который специфически связывается с антигеном, экспрессируемым клеткой или тканью заболевания или состояния или ассоциированным с заболеванием или состоянием.

TCR

В некоторых воплощениях генетическая модификация включает генетическую модификацию клеток для экспрессии одного или нескольких Т-клеточных рецепторов (TCR) или их антигенсвязывающей части, которая распознает пептидный эпитоп или Т-клеточный эпитоп целевого полипептида, такого как антиген опухоли, вирусный или аутоиммунный белок.

В некоторых воплощениях «Т-клеточный рецептор» или «TCR» представляет собой молекулу, которая содержит вариабельные α и β -цепи (также известные как TCR α и TCR β , соответственно) или вариабельные γ - и δ -цепи (также известные как TCR γ и TCR δ , соответственно) или их антигенсвязывающие части, и которая способна специфически связываться с пептидом, связанным с молекулой МНС. В некоторых воплощениях TCR находится в форме $\alpha\beta$. Как правило, TCR, которые существуют в формах $\alpha\beta$ и $\gamma\delta$, обычно структурно сходны, но экспрессирующие их Т-клетки могут иметь различные анатомические расположения или функции. TCR может быть найден на поверхности клетки или в растворимой форме. Как правило, TCR обнаруживается на поверхности Т-клеток (или Т-лимфоцитов), где он обычно отвечает за распознавание антигенов, связанных с молекулами главного комплекса гистосовместимости (МНС).

Если не указано иное, термин «TCR» следует понимать как охватывающий полные TCR, а также антигенсвязывающие части или их антигенсвязывающие фрагменты. В некоторых воплощениях TCR представляет собой интактный или полноразмерный TCR, включая TCR в форме $\alpha\beta$ или $\gamma\delta$. В некоторых воплощениях TCR представляет собой антигенсвязывающую часть, которая меньше полноразмерного TCR, но которая связывается со специфическим пептидом, связанным в молекуле МНС, например, связывается с комплексом МНС-пептид. В некоторых случаях антигенсвязывающая часть или фрагмент TCR может содержать только часть структурных доменов полноразмерного или интактного TCR, но все же способна связывать пептидный эпитоп, такой как комплекс МНС-пептид, с которым связывается полный TCR. В некоторых случаях антигенсвязывающая часть содержит вариабельные домены TCR, такие как вариабельная α -цепь и вариабельная β -цепь TCR, достаточные для образования сайта связывания для связывания со специфическим комплексом МНС-пептид. Как правило, вариабельные цепи TCR содержат определяющие комплементарность области, участвующие в распознавании пептида, МНС и/или комплекса МНС-пептид.

В некоторых воплощениях вариабельные домены TCR содержат гипервариабельные петли или определяющие комплементарность области (CDR), которые, как правило, являются основными вкладчиками в способность распознавания и связывания антигена и его специфичность. В некоторых воплощениях CDR из TCR или их комбинации образуют весь или по существу весь антигенсвязывающий сайт данной молекулы TCR. Различные CDR в вариабельной области цепи TCR обычно разделяются каркасными областями (FR), которые обычно демонстрируют меньшую вариабельность среди молекул TCR по сравнению с CDR (см., например, Jores et al., Proc. Nat'l Acad., Sci. U.S.A. 87:9138, 1990; Chothia et al., EMBO J. 7:3745, 1988; см. также Lefranc et al., Dev.

Comp. Immunol. 27:55, 2003). В некоторых воплощениях CDR3 является основным CDR, ответственным за связывание или специфичность антигена, или является наиболее важным среди трех CDR в данной вариабельной области TCR для распознавания антигена и/или для взаимодействия с обработанной пептидной частью комплекса пептид-MHC. В некоторых контекстах CDR1 альфа-цепи может взаимодействовать с N-концевой частью определенных антигенных пептидов. В некоторых контекстах CDR1 бета-цепи может взаимодействовать с C-концевой частью пептида. В некоторых контекстах CDR2 вносит наиболее сильный вклад или является первичным CDR, ответственным за взаимодействие или распознавание части MHC комплекса MHC-пептид. В некоторых воплощениях вариабельная область β -цепи может содержать дополнительную гипервариабельную область (CDR4 или HVR4), которая обычно участвует в связывании суперантигена, а не в распознавании антигена (Kotb (1995) *Clinical Microbiology Reviews*, 8: 411-426).

В некоторых воплощениях TCR также может содержать константный домен, трансмембранный домен и/или короткий цитоплазматический хвост (см., например, Janeway et al., *Immunobiology: Immune System in Health and Disease*, 3rd Ed., Current Biology Publications, стр. 4:33, 1997). В некоторых аспектах каждая цепь TCR может иметь один N-концевой вариабельный домен иммуноглобулина, один константный домен иммуноглобулина, трансмембранную область и короткий цитоплазматический хвост на C-конце. В некоторых воплощениях TCR связан с инвариантными белками комплекса CD3, участвующими в передаче сигнала.

В некоторых воплощениях цепь TCR содержит один или несколько константных доменов. Например, внеклеточный участок данной цепи TCR (например, α -цепь или β -цепь) может содержать два иммуноглобулиноподобных домена, таких как вариабельный домен (например, $V\alpha$ или $V\beta$; обычно аминокислоты с 1 по 116 на основе нумерации Kabat (Kabat et al., "Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Dept. Health and Human Services, Public Health Service National Institutes of Health, 1991, 5th ed.)) и константный домен (например, константный домен α -цепи или $C\alpha$, обычно положения 117–259 цепи на основании нумерации Kabat или константный домен β -цепи или $C\beta$, обычно положения 117–295 цепи на основании нумерации Kabat), расположенные рядом с клеточной мембраной. Например, в некоторых случаях внеклеточная часть TCR, образованная двумя цепями, содержит два мембранно-проксимальных константных домена и два мембранно-дистальных вариабельных домена, каждый из которых содержит CDR. Константный домен TCR может содержать короткие соединительные последовательности, в которых остаток цистеина образует дисульфидную связь, тем самым связывая две цепи TCR. В некоторых воплощениях TCR может иметь

дополнительный остаток цистеина в каждой из α - и β -цепей, так что TCR содержит две дисульфидные связи в константных доменах.

В некоторых воплощениях цепи TCR содержат трансмембранный домен. В некоторых воплощениях трансмембранный домен является положительно заряженным. В некоторых случаях цепь TCR содержит цитоплазматический хвост. В некоторых случаях структура позволяет TCR связываться с другими молекулами, такими как CD3 и их субъединицы. Например, TCR, содержащий константные домены с трансмембранной областью, может закреплять белок в клеточной мембране и связываться с инвариантными субъединицами сигнального устройства или комплекса CD3. Внутриклеточные хвосты сигнальных субъединиц CD3 (например, цепей CD3 γ , CD3 δ , CD3 ϵ и CD3 ζ) содержат один или несколько иммунорецепторных тирозиновых активирующих мотивов или ITAM, которые участвуют в сигнальной способности комплекса TCR.

В некоторых воплощениях TCR может представлять собой гетеродимер с двумя цепями α и β (или необязательно γ и δ), или он может представлять собой одноцепочечную конструкцию TCR. В некоторых воплощениях TCR представляет собой гетеродимер, содержащий две отдельные цепи (α - и β -цепи или γ - и δ -цепи), которые связаны, например, дисульфидной связью или дисульфидными связями.

В некоторых воплощениях TCR может быть сгенерирован из известной последовательности (последовательностей) TCR, такой как последовательности цепей V α , β , для которых легко доступна по существу полноразмерная кодирующая последовательность. Способы получения полноразмерных последовательностей TCR, включая последовательности V-цепей, из клеточных источников хорошо известны. В некоторых воплощениях нуклеиновые кислоты, кодирующие TCR, могут быть получены из различных источников, таких как амплификация полимеразной цепной реакции (ПЦР) нуклеиновых кислот, кодирующих TCR, внутри или выделенных из данной клетки или клеток, или синтез общедоступных последовательностей ДНК для TCR.

В некоторых воплощениях TCR получают из биологического источника, такого как клетки, такие как Т-клетки (например, цитотоксические Т-клетки), Т-клеточные гибридомы или другие общедоступные источники. В некоторых воплощениях Т-клетки могут быть получены из выделенных клеток *in vivo*. В некоторых воплощениях TCR представляет собой отобранные в тимусе TCR. В некоторых воплощениях TCR представляет собой ограниченные неоэпитопом TCR. В некоторых воплощениях Т-клетки могут представлять собой культивируемую Т-клеточную гибридому или клон. В некоторых воплощениях TCR или его антигенсвязывающая часть могут быть получены синтетическим путем на основании знания последовательности TCR.

В некоторых воплощениях TCR генерируется из TCR, идентифицированного или выбранного из скрининга библиотеки кандидатов TCR против целевого полипептидного антигена или его целевого Т-клеточного эпитопа. Библиотеки TCR могут быть получены путем амплификации репертуара $V\alpha$ и $V\beta$ из Т-клеток, выделенных из объекта, включая клетки, присутствующие в PBMC, селезенке или другом лимфоидном органе. В некоторых случаях Т-клетки могут быть амплифицированы из инфильтрирующих опухоль лимфоцитов (TIL). В некоторых воплощениях библиотеки TCR могут быть получены из $CD4^+$ клеток или $CD8^+$ клеток. В некоторых воплощениях TCR можно амплифицировать из источника Т-клеток нормального здорового объекта, то есть нормальных библиотек TCR. В некоторых воплощениях TCR могут быть амплифицированы из источника Т-клеток больного объекта, то есть библиотек TCR болезни. В некоторых воплощениях вырожденные праймеры используются для амплификации репертуара генов $V\alpha$ и $V\beta$, например, с помощью ОТ-ПЦР в образцах, таких как Т-клетки, полученные от людей. В некоторых воплощениях библиотеки scTv могут быть собраны из наивных библиотек $V\alpha$ и $V\beta$, в которых амплифицированные продукты клонированы или собраны для разделения линкером. В зависимости от источника объекта и клеток, библиотеки могут быть HLA-аллель-специфичными. В иных случаях, в некоторых воплощениях библиотеки TCR могут быть получены путем мутагенеза или диверсификации родительской или каркасной молекулы TCR. В некоторых аспектах TCR подвергаются направленной эволюции, такой как мутагенез, например, α - или β -цепи. В некоторых аспектах определенные остатки в CDR из TCR изменены. В некоторых воплощениях отобранные TCR можно модифицировать путем созревания аффинности. В некоторых воплощениях антиген-специфические Т-клетки могут быть выбраны, например, путем скрининга для оценки активности CTL против пептида. В некоторых аспектах TCR, например, присутствующие в антигенспецифических Т-клетках, могут быть выбраны, например, посредством активности связывания, например, определенной аффинности или авидности к антигену.

В некоторых воплощениях TCR или его антигенсвязывающая часть является таковыми, которые были модифицированы или сконструированы. В некоторых воплощениях способы направленной эволюции используются для создания TCR с измененными свойствами, такими как более высокое сродство к конкретному комплексу МНС-пептид. В некоторых воплощениях направленная эволюция достигается способами дисплея, включая, без ограничения указанным, дрожжевой дисплей (Holler et al. (2003) Nat Immunol, 4, 55-62; Holler et al. (2000) Proc Natl Acad Sci USA, 97, 5387-92), фаговый дисплей (Li et al. (2005) Nat Biotechnol, 23, 349-54) или Т-клеточный дисплей (Chervin et al.

(2008) *J Immunol Methods*, 339, 175-84). В некоторых воплощениях дисплейные подходы включают конструирование или модификацию известного, родительского или эталонного TCR. Например, в некоторых случаях TCR дикого типа можно использовать в качестве матрицы для получения мутагенизированных TCR, CDR в которых мутированы в одном или нескольких остатках, в результате чего отбираются мутанты с искомым измененным свойством, таким как более высокая аффинность к искомому целевому антигену.

В некоторых воплощениях пептиды целевого полипептида для применения при получении или создании интересующего TCR известны или могут быть легко идентифицированы специалистом в данной области. В некоторых воплощениях пептиды, подходящие для применения в создании TCR или антигенсвязывающих участков, могут быть определены на основании присутствия HLA-рестриктированного мотива в представляющем интерес целевом полипептиде, таком как целевой полипептид, описанный ниже. В некоторых воплощениях мотивы связывания HLA-A0201, сайты расщепления для протеасом и иммунных протеасом и пептиды идентифицируют с использованием моделей компьютерного прогнозирования, известных специалистам в данной области. В некоторых воплощениях для прогнозирования сайтов связывания MHC класса I такие модели включают, без ограничения указанным, ProPred1 (Singh and Raghava (2001) *Bioinformatics* 17 (12): 1236-1237) и SYFPEITHI (см. Schuler et al. (2007) *Immunoinformatics Methods in Molecular Biology*, 409(1): 75-93 2007). В некоторых воплощениях MHC-рестриктированный эпитоп представляет собой HLA-A0201, который экспрессируется в около 39-46% всех европеоидов и, следовательно, представляет собой подходящий выбор антигена MHC для применения при получении TCR или другой молекулы, связывающей MHC-пептид.

В некоторых воплощениях TCR или его антигенсвязывающая часть может представлять собой рекомбинантно продуцированный природный белок или его мутированную форму, в которой одно или несколько свойств, таких как связывание характеристики, были изменены. В некоторых воплощениях TCR может быть получен от одного из различных видов животных, таких как человек, мышь, крыса или другое млекопитающее. TCR может быть связанным с клеткой или находиться в растворимой форме. В некоторых воплощениях для целей предоставленных способов TCR находится в связанной с клеткой форме, экспрессируемой на поверхности клетки.

В некоторых воплощениях TCR является полноразмерным TCR. В некоторых воплощениях TCR представляет собой антигенсвязывающую часть. В некоторых воплощениях TCR представляет собой димерный TCR (dTCR). В некоторых воплощениях TCR представляет собой одноцепочечный TCR (sc-TCR). В некоторых воплощениях dTCR

или scTCR имеют структуры, как описано в WO 03/020763, WO 04/033685, WO 2011/044186, которые включены в данный документ ссылкой.

В некоторых воплощениях TCR содержит последовательность, соответствующую трансмембранной последовательности. В некоторых воплощениях TCR действительно содержит последовательность, соответствующую цитоплазматическим последовательностям. В некоторых воплощениях TCR способен образовывать комплекс TCR с CD3. В некоторых воплощениях любой из TCR, включая dTCR или scTCR, может быть связан с доменами сигнализации, которые дают активный TCR на поверхности Т-клетки. В некоторых воплощениях TCR экспрессируется на поверхности клеток.

В некоторых воплощениях dTCR содержит первый полипептид, где последовательность, соответствующая последовательности вариабельной области α -цепи TCR, слита с N-концом последовательности, соответствующей внеклеточной последовательности константной области α -цепи TCR, и второй полипептид, где последовательность, соответствующая последовательности вариабельной области β -цепи TCR, слита с N-концом последовательности, соответствующей внеклеточной последовательности константной области β -цепи TCR, причем первый и второй полипептиды связаны дисульфидной связью. В некоторых воплощениях связь может соответствовать нативной межцепочечной дисульфидной связи, присутствующей в нативных димерных $\alpha\beta$ TCR. В некоторых воплощениях межцепочечные дисульфидные связи не присутствуют в нативном TCR. Например, в некоторых воплощениях один или несколько цистеинов могут быть включены во внеклеточные последовательности константной области полипептидной пары dTCR. В некоторых случаях может быть желательной как нативная, так и ненативная дисульфидная связь. В некоторых воплощениях TCR содержит трансмембранную последовательность для закрепления на мембране.

В некоторых воплощениях dTCR содержит α -цепь TCR, содержащую вариабельный α -домен, константный α -домен и первый мотив димеризации, присоединенный к С-концу константного α -домена, и β -цепь TCR, содержащую вариабельный β -домен, константный β -домен и первый мотив димеризации, присоединенные к С-концу константного β -домена, где первый и второй мотивы димеризации легко взаимодействуют, образуя ковалентную связь между аминокислотой в первом мотиве димеризации и аминокислотой во втором мотиве димеризации, связывающий α -цепь TCR и β -цепь TCR вместе.

В некоторых воплощениях TCR представляет собой scTCR. Как правило, scTCR может быть получен с использованием способов, известных специалистам в данной

области, см., например, Soo Hoo, WF et al. PNAS (USA) 89, 4759 (1992); Wülfing, C. and Plückthun, A., J. Mol. Biol. 242, 655 (1994); Kurucz, I. et al. PNAS (США) 90 3830 (1993); публикации заявок PCT № WO 96/13593, WO 96/18105, WO 99/60120, WO 99/18129, WO 03/020763, WO 2011/044186; и Schlueter, CJ et al. J. Mol. Biol. 256, 859 (1996). В некоторых воплощениях scTCR содержит введенную ненативную дисульфидную межцепочечную связь для облегчения ассоциации цепей TCR (см., например, публикацию заявки PCT № WO 03/020763, которая включена в настоящий документ ссылкой). В некоторых воплощениях scTCR представляет собой укороченный TCR с недисульфидной связью, в котором гетерологичные лейциновые молнии, слитые с их С-концами, облегчают ассоциацию цепи (см., например, публикацию заявки PCT № WO99/60120, которая включена в настоящий документ ссылкой). В некоторых воплощениях scTCR содержит переменный домен TCR α , ковалентно связанный с переменным доменом TCR β через пептидный линкер (см., например, публикацию заявки PCT № WO 99/18129, которая включена в настоящий документ ссылкой).

В некоторых воплощениях scTCR содержит первый сегмент, состоящий из аминокислотной последовательности, соответствующей переменной области α -цепи TCR, второй сегмент, состоящий из аминокислотной последовательности, соответствующей последовательности переменной области β -цепи TCR, слитой с N-концом аминокислотной последовательности, соответствующей внеклеточной последовательности константного домена β -цепи TCR, и линкерную последовательность, связывающую С-конец первого сегмента с N-концом второго сегмента.

В некоторых воплощениях scTCR содержит первый сегмент, состоящий из последовательности переменной области α -цепи, слитой с N-концом последовательности внеклеточного константного домена α -цепи, и второй сегмент, состоящий из последовательности переменной области α -цепи, слитой с N-концом последовательности β -цепи внеклеточной константы и трансмембранную последовательность и, необязательно, последовательность линкера, связывающую С-конец первого сегмента с N-концом второго сегмента.

В некоторых воплощениях scTCR содержит первый сегмент, состоящий из последовательности переменной области β -цепи TCR, слитой с N-концом последовательности внеклеточного константного домена β -цепи, и второй сегмент, состоящий из последовательности переменной области α -цепи, слитой с N-концом последовательности внеклеточной константы α -цепи и трансмембранной последовательности и, необязательно, последовательности линкера, связывающей С-конец первого сегмента с N-концом второго сегмента.

В некоторых воплощениях линкер scTCR, который связывает первый и второй сегменты TCR, может представлять собой любой линкер, способный образовывать одну цепь полипептида, сохраняя при этом специфичность связывания TCR. В некоторых воплощениях линкерная последовательность может, например, иметь формулу -P-AA-P-, где P представляет собой пролин, а AA представляет собой аминокислотную последовательность, где аминокислоты представляют собой глицин и/или серин. В некоторых воплощениях первый и второй сегменты спарены так, что их последовательности вариабельной области ориентированы для такого связывания. Следовательно, в некоторых случаях линкер имеет достаточную длину, чтобы охватить расстояние между С-концом первого сегмента и N-концом второго сегмента или наоборот, но он не слишком длинный, чтобы блокировать или уменьшать связывание scTCR с целевым лигандом. В некоторых воплощениях линкер может содержать от или от около 10 до 45 аминокислот, таких как от 10 до 30 аминокислот или от 26 до 41 аминокислотного остатка, например, 29, 30, 31 или 32 аминокислоты. В некоторых воплощениях линкер имеет формулу -PGGG- (SGGGG) 5-P-, где P представляет собой пролин, G представляет собой глицин и S представляет собой серин. В некоторых воплощениях линкер имеет последовательность GSADDAKKDAAKKDGKS.

В некоторых воплощениях scTCR содержит ковалентную дисульфидную связь, связывающую остаток области иммуноглобулина константного домена α -цепи с остатком области иммуноглобулина константного домена β -цепи. В некоторых воплощениях межцепочечная дисульфидная связь в нативном TCR отсутствует. Например, в некоторых воплощениях один или несколько цистеинов могут быть включены во внеклеточные последовательности константной области первого и второго сегментов полипептида scTCR. В некоторых случаях может быть желательной как нативная, так и ненативная дисульфидная связь.

В некоторых воплощениях реализации dTCR или scTCR, содержащих введенные межцепочечные дисульфидные связи, нативные дисульфидные связи отсутствуют. В некоторых воплощениях один или несколько нативных цистеинов, образующих нативные межцепочечные дисульфидные связи, замещены другим остатком, таким как серин или аланин. В некоторых воплощениях введенная дисульфидная связь может быть образована путем мутации нецистеиновых остатков на первом и втором сегментах с цистеином. Типичные ненативные дисульфидные связи TCR описаны в публикации заявки РСТ № WO 2006/000830, которая включена в настоящий документ ссылкой.

В некоторых воплощениях TCR или его антигенсвязывающий фрагмент проявляет сродство с константой равновесного связывания с целевым антигеном между или между

около 10-5 и 10-12 М и всеми отдельными значениями и диапазонами в этих пределах. В некоторых воплощениях антиген-мишень представляет собой комплекс МНС-пептид или лиганд.

В некоторых воплощениях нуклеиновую кислоту или нуклеиновые кислоты, кодирующие TCR, такие как α - и β -цепи, можно амплифицировать с помощью ПЦР или других подходящих способов и клонировать в подходящий вектор или векторы экспрессии. Вектор экспрессии может представлять собой любой подходящий рекомбинантный вектор экспрессии и может использоваться для трансформации или трансфекции любого подходящего хозяина. Подходящие векторы включают векторы, предназначенные для размножения и экспансии, или для экспрессии, или того и другого, такие как плазмиды и вирусы.

В некоторых воплощениях вектор может представлять собой вектор из серии pUC (Fermentas Life Sciences), серии pBluescript (Stratagene, Ла-Хойя, Калифорния), серии pET (Novagen, Мэдисон, Висконсин), серии pGEX (Pharmacia Biotech, Упсала, Швеция) или серии pEX (Clontech, Пало-Альто, Калифорния). В некоторых случаях также можно использовать векторы бактериофагов, такие как λ G10, λ GT11, λ ZapII (Stratagene), λ EMBL4 и λ NM1149. В некоторых воплощениях могут использоваться векторы для экспрессии в растениях, и они включают pBI01, pBI101.2, pBI101.3, pBI121 и pBIN19 (Clontech). В некоторых воплощениях векторы экспрессии в животных включают pEUK-CI, pMAM и pMAMneo (Clontech). В некоторых воплощениях используется вирусный вектор, такой как ретровирусный вектор.

В некоторых воплощениях рекомбинантные векторы экспрессии могут быть получены с использованием стандартных методов рекомбинантных ДНК. В некоторых воплощениях векторы могут содержать регуляторные последовательности, такие как кодоны инициации и терминации транскрипции и трансляции, которые специфичны для типа хозяина (например, бактерии, гриба, растения или животного), в который должен быть введен вектор, соответствующим образом, и, принимая во внимание, основан ли вектор на ДНК или РНК. В некоторых воплощениях вектор может содержать ненативный промотор, функционально связанный с нуклеотидной последовательностью, кодирующей TCR или его антигенсвязывающую часть (или другую молекулу, связывающую МНС-пептид). В некоторых воплощениях промотор может быть невирусным промотором или вирусным промотором, таким как промотор цитомегаловируса (CMV), промотор SV40, промотор RSV и промотор, обнаруженный в длинном концевом повторе мышинного вируса стволовых клеток. Другие промоторы, известные специалисту в данной области, также рассматриваются.

В некоторых воплощениях для получения вектора, кодирующего TCR, α - и β -цепи амплифицируют с помощью ПЦР из общей кДНК, выделенной из клона Т-клеток, экспрессирующего представляющий интерес TCR, и клонируют в вектор экспрессии. В некоторых воплощениях α - и β -цепи клонируются в один и тот же вектор. В некоторых воплощениях α - и β -цепи клонируются в разные векторы. В некоторых воплощениях полученные α - и β -цепи включены в ретровирусный, например, лентивирусный вектор.

Множественное нацеливание

В некоторых воплощениях генетическая модификация включает генетическую модификацию клеток для экспрессии двух или более генно-инженерных рецепторов на клетке, каждый из которых распознает один и тот же или другой антиген и, в некоторых воплощениях, каждый включает разные компоненты внутриклеточной сигнализации. Такие стратегии множественного нацеливания описаны, например, в публикации патентной заявки PCT WO 2014/055668 A1 и Fedorov et al., *Sci. Transl. Medicine*, 5(215) (2013).

Например, в некоторых воплощениях клетки включают рецептор, экспрессирующий первый генетически сконструированный рецептор антигена (например, CAR или TCR), который способен индуцировать активирующий сигнал в клетку, как правило, при специфическом связывании с антигеном, распознаваемым первым рецептором, например, первым антигеном. В некоторых воплощениях клетка дополнительно включает второй генно-инженерный антигенный рецептор (например, CAR или TCR), например, химерный костимулирующий рецептор, который способен индуцировать костимулирующий сигнал для иммунной клетки, как правило, при специфическом связывании со вторым антигеном, распознаваемым вторым рецептором. В некоторых воплощениях первый антиген и второй антиген являются одинаковыми. В некоторых воплощениях первый антиген и второй антиген различны.

В некоторых воплощениях первый и/или второй генно-инженерный антигенный рецептор (например, CAR или TCR) способен индуцировать активирующий сигнал в клетку. В некоторых воплощениях рецептор включает внутриклеточный сигнальный компонент, содержащий ITAM или ITAM-подобные мотивы. В некоторых воплощениях активация, индуцированная первым рецептором, включает трансдукцию сигнала или изменение экспрессии белка в клетке, что приводит к инициации иммунного ответа, такого как фосфорилирование ITAM и/или инициирование каскада трансдукции сигнала, опосредованного ITAM, с образованием иммунологического синапса и/или кластеризации молекул вблизи связанного рецептора (например, CD4 или CD8 и т.д.), активации одного или нескольких факторов транскрипции, таких как NF- κ B и/или AP-1, и/или индукции

генной экспрессии факторов, таких как цитокины, пролиферации и/или выживания.

В некоторых воплощениях первый и/или второй рецептор включает внутриклеточные сигнальные домены костимулирующих рецепторов, таких как CD28, CD137 (4-1 BB), OX40 и/или ICOS. В некоторых воплощениях первый и второй рецепторы включают внутриклеточный сигнальный домен костимулирующего рецептора, которые отличаются. В некоторых воплощениях первый рецептор содержит костимулирующую сигнальную область CD28, а второй рецептор содержит костимулирующую сигнальную область 4-1BB или наоборот.

В некоторых воплощениях первый и/или второй рецептор включает как внутриклеточный сигнальный домен, содержащий ITAM или ITAM-подобные мотивы, так и внутриклеточный сигнальный домен костимулирующего рецептора.

В некоторых воплощениях первый рецептор содержит внутриклеточный сигнальный домен, содержащий ITAM или ITAM-подобные мотивы, а второй рецептор содержит внутриклеточный сигнальный домен костимулирующего рецептора. Костимулирующий сигнал в комбинации с активирующим сигналом, индуцированным в той же клетке, является сигналом, который приводит к иммунному ответу, такому как устойчивый и долговременный иммунный ответ, такой как повышенная экспрессия генов, секреция цитокинов и других факторов, и опосредованные Т-клетками эффекторные функции, такие как уничтожение клеток.

В некоторых воплощениях ни связывание одного первого рецептора, ни связывание одного второго рецептора не вызывает сильного иммунного ответа. В некоторых аспектах, если лигируется только один рецептор, клетка становится толерантной или не реагирующей на антиген или ингибируемой и/или не индуцируемой пролиферировать или секретировать факторы или выполнять эффекторные функции. Однако в некоторых таких воплощениях, когда лигируют множество рецепторов, например, при встрече с клеткой, экспрессирующей первый и второй антигены, достигается искомый ответ, такой как полная иммунная активация или стимуляция, например, как показано секрецией одного или нескольких цитокинов, пролиферацией, персистенцией и/или выполнением иммунной эффекторной функции, такой как цитотоксическое уничтожение клетки-мишени.

В некоторых воплощениях два рецептора индуцируют, соответственно, активирующий и ингибирующий сигнал к клетке, так что связывание одного из рецепторов с его антигеном активирует клетку или вызывает ответ, а связывание второго ингибирующего рецептора с его антигеном вызывает сигнал, который подавляет или ослабляет эту реакцию. Примерами являются комбинации активирующих CAR и

ингибирующих CAR или iCAR. Такая стратегия может быть использована, например, когда активирующий CAR связывает антиген, экспрессируемый при заболевании или состоянии, но который также экспрессируется на нормальных клетках, а ингибирующий рецептор связывается с отдельным антигеном, который экспрессируется на нормальных клетках, но не клетках заболевания или состояния.

В некоторых воплощениях стратегия множественного нацеливания применяется в случае, когда антиген, ассоциированный с конкретным заболеванием или состоянием, экспрессируется на подвергнутой заболеванию клетке и/или экспрессируется на самой сконструированной клетке, либо транзиторно (например, при стимуляции в связи с генной инженерией), либо перманентно. В таких случаях, требуя лигирования двух отдельных и индивидуально специфических антигенных рецепторов, можно улучшить специфичность, селективность и/или эффективность.

В некоторых воплощениях множество антигенов, например, первый и второй антигены, экспрессируются на клетке, ткани или при заболевании или состоянии, являющемся мишенью, например, на злокачественной опухолевой клетке. В некоторых аспектах клетка, ткань, заболевание или состояние представляет собой множественную миелому или клетку множественной миеломы. В некоторых воплощениях один или несколько из множества антигенов, как правило, также экспрессируются на клетке, которую нежелательно нацеливать с помощью клеточной терапии, такой как нормальная или не пораженная болезнью клетка или ткань и/или сами сконструированные клетки. В таких воплощениях, путем требования лигирования множества рецепторов для достижения ответа клетки, достигается специфичность и/или эффективность.

В некоторых воплощениях модификация клеток выполняется на основе анализа клеток после сбора и перед криогенным замораживанием и/или хранением. Клетки могут быть модифицированы на основе анализа до и/или после криогенного хранения. В некоторых воплощениях модификация клеток выполняется на основе анализа клеток после оттаивания после криогенного хранения. В некоторых воплощениях анализ включает определение отношения $CD4^+$ -клеток к $CD8^+$ -клеткам. В некоторых воплощениях условия для посткриогенной модификации, такие как время инкубации клеток, температура для инкубации клеток, использование и концентрация стимулятора клеток и стадии генетической модификации клеток, могут быть выбраны на основе анализа или могут быть выбраны на основе отношения $CD4^+$ клеток к $CD8^+$ клеткам.

Векторы для сконструированных клеток

Полинуклеотиды (молекулы нуклеиновой кислоты), кодирующие рекомбинантные рецепторы и/или TCR, могут быть включены в векторы для генной инженерии клеток для

экспрессии таких рецепторов. В некоторых воплощениях векторы или конструкции содержат один или несколько промоторов, функционально связанных с нуклеотидом, кодирующим полипептид или рецептор, для управления его экспрессией. В некоторых воплощениях промотор функционально связан с одной или несколькими молекулами нуклеиновой кислоты. В некоторых случаях вектор представляет собой вирусный вектор, такой как ретровирусный вектор, например, лентивирусный вектор или гамма-ретровирусный вектор. В некоторых воплощениях полинуклеотид, такой как вектор, кодирующий рекомбинантный рецептор, вводится в композицию, содержащую культивируемые клетки, например, путем ретровирусной трансдукции, трансфекции или трансформации.

Различные способы введения генно-инженерных компонентов, например, рекомбинантных рецепторов, например, CAR или TCR, хорошо известны и могут использоваться с предоставленными способами и композициями. Примеры способов включают способы переноса нуклеиновых кислот, кодирующих полипептиды или рецепторы, в том числе через вирусные векторы, например, ретровирусные или лентивирусные, невирусные векторы или транспозоны, например, транспозонную систему Sleeping Beauty. Методы переноса гена могут включать трансдукцию, электропорацию или другой способ, который приводит к переносу гена в клетку.

В некоторых воплощениях перенос гена осуществляется сначала путем стимуляции клетки, например, путем объединения ее со стимулом, который индуцирует ответ, такой как пролиферация, выживание и/или активация, например, измеренные экспрессией цитокина или маркера активации, с последующей трансдукцией активированных клеток и экспансией в культуру до количества, достаточного для клинического применения.

В некоторых контекстах может быть желательно защититься от потенциальной возможности того, что сверхэкспрессия стимулирующего фактора (например, лимфокина или цитокина) может потенциально привести к нежелательному исходу или снижению эффективности у объекта, такого как фактор, связанный с токсичностью в объекте. Таким образом, в некоторых контекстах сконструированные клетки включают генные сегменты, которые вызывают чувствительность клеток к негативному отбору *in vivo*, например, при введении в адоптивной иммунотерапии. Например, в некоторых аспектах клетки сконструированы так, что они могут быть удалены в результате изменения состояния *in vivo* пациента, которому они вводятся. Отрицательный отбираемый фенотип может быть результатом включения гена, который придает чувствительность к вводимому агенту, например, соединению. Отрицательно отбираемые гены включают ген тимидинкиназы вируса простого герпеса типа I (HSV-I TK) (Wigler et al., Cell II: 223, 1977), который

придает чувствительность к ганцикловиру, ген клеточной гипоксантин-фосфорибозилтрансферазы (HPRT), ген клеточной аденинфосфорибозилтрансферазы (APRT), бактериальную цитозин-деаминазу (Mullen et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 89:33 (1992)), и т.д.

В некоторых воплощениях рекомбинантные нуклеиновые кислоты переносятся в клетки с использованием частиц рекомбинантных инфекционных вирусов, таких как, например, векторы, полученные из вируса обезьяньего гриппа 40 (SV40), аденовирусы, аденоассоциированный вирус (AAV) и т.д. В некоторых воплощениях рекомбинантные нуклеиновые кислоты переносятся в Т-клетки с использованием рекомбинантных лентивирусных векторов или ретровирусных векторов, таких как гамма-ретровирусные векторы (см., например, Koste et al. (2014) Gene Therapy 2014 Apr 3. doi: 10.1038/gt.2014.25; Carlens et al. (2000) Exp Hematol 28(10): 1137-46; Alonso-Camino et al. (2013) Mol Ther Nucl Acids 2, e93; Park et al., Trends Biotechnol. 2011 November 29(11): 550–557).

В некоторых воплощениях ретровирусный вектор имеет длинную концевую повторяющуюся последовательность (LTR), например, ретровирусный вектор, полученный из вируса мышинного лейкоза Молони (MoMLV), вируса миелопролиферативной саркомы (MPSV), мышинного вируса эмбриональных стволовых клеток (MESV), мышинного вируса стволовых клеток (MSCV), вируса некроза селезенки (SFFV), или аденоассоциированного вируса (AAV). Большинство ретровирусных векторов происходят из мышинных ретровирусов. В некоторых воплощениях ретровирусы включают те, которые получены из любого клеточного источника птиц или млекопитающих. Ретровирусы, как правило, являются амфотропными, что означает, что они способны инфицировать клетки-хозяева нескольких видов, включая человека. В одном воплощении экспрессируемый ген заменяет ретровирусные последовательности gag, pol и/или env. Был описан ряд иллюстративных ретровирусных систем (например, патенты США №№ 5,219,740; 6,207,453; 5,219,740; Miller и Rosman (1989) BioTechniques 7: 980-990; Miller, AD (1990) Human Gene Therapy 1:5-14; Scarpa et al. (1991) Virology 180:849-852; Burns et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:8033-8037; and Boris-Lawrie and Temin (1993) Cur. Opin. Genet. Develop. 3:102-109).

Способы лентивирусной трансдукции известны. Примерные способы описаны, например, в Wang et al. (2012) J. Immunother. 35(9): 689-701; Cooper et al. (2003) Blood. 101:1637–1644; Verhoeven et al. (2009) Methods Mol Biol. 506: 97-114; и Cavalieri et al. (2003) Blood. 102(2): 497-505.

В некоторых воплощениях рекомбинантные нуклеиновые кислоты переносятся в

Т-клетки посредством электропорации (см., например, Chicaybam et al., (2013) PLoS ONE 8 (3): e60298 и Van Tedeloo et al. (2000) Gene Therapy 7(16): 1431-1437). В некоторых воплощениях рекомбинантные нуклеиновые кислоты переносятся в Т-клетки посредством транспозиции (см., например, Manuri et al. (2010) Hum Gene Ther 21(4): 427-437; Sharma et al. (2013) Molec Ther Nucl Acids 2, e74; и Huang et al. (2009) Methods Mol Biol 506: 115-126). Другие способы введения и экспрессии генетического материала в иммунных клетках включают трансфекцию фосфатом кальция (например, как описано в Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York, NY), слияние протопластов, катионную опосредованную липосомами трансфекцию; бомбардировку микрочастицами частиц вольфрама (Johnston, Nature, 346: 776-777 (1990)); и соосаждение ДНК фосфатом стронция (Brash et al., Mol. Cell Biol., 7: 2031-2034 (1987)). В некоторых аспектах, стадия промывки выполняется в центрифужной камере, например, в камере, которая производится и продается BIOSAFE SA, в том числе для применения с системами Sepax[®] и Sepax[®] 2, в том числе центрифужных камерах А-200/F и А-200 в соответствии с инструкциями производителя.

Другими подходами и векторами для переноса нуклеиновых кислот, кодирующих рекомбинантные продукты, являются те, которые описаны, например, в патентной заявке РСТ, публикации №: WO/2014055668 и патенте США № 7,446,190, которые включены в настоящий документ ссылкой.

В некоторых воплощениях клетки, например, Т-клетки, могут быть трансфицированы либо во время, либо после экспансии, например, с помощью рецептора Т-клеток (TCR) или химерного антигенного рецептора (CAR). Эта трансфекция для введения гена искомого полипептида или рецептора может быть осуществлена, например, с любым подходящим ретровирусным вектором. Затем генетически модифицированную популяцию клеток можно освободить от исходного стимула (например, стимула CD3/CD28) и затем стимулировать стимулом второго типа (например, через *de novo* введенный рецептор). Этот второй тип стимула может включать антигенный стимул в форме молекулы пептид/МНС, родственной (сшивающий) лиганд генетически введенного рецептора (например, естественный лиганд CAR) или любой лиганд (такой как антитело), который непосредственно связывается в рамках нового рецептора (например, путем распознавания константных областей внутри рецептора). См., например, Cheadle et al, “Chimeric antigen receptors for T-cell based therapy” Methods Mol Biol. 2012; 907:645-66 or Barrett et al., Chimeric Antigen Receptor Therapy for Cancer Annual Review of Medicine Vol. 65: 333-347 (2014).

Среди дополнительных нуклеиновых кислот, например, гены для введения - это

гены, которые повышают эффективность терапии, например, путем стимулирования жизнеспособности и/или функции перенесенных клеток; гены для обеспечения генетического маркера для отбора и/или оценки клеток, например, для оценки выживаемости или локализации *in vivo*; и гены для повышения безопасности, например, те, которые делают клетку восприимчивой к отрицательному отбору *in vivo*, как описано Lupton SD et al., *Mol. и Cell Biol.*, 11: 6 (1991); и Riddell et al. *Human Therapy* 3: 319-338 (1992); см. также публикации PCT/US91/08442 и PCT/US94/05601 Lupton et al., описывающие применения бифункциональных селективируемых химерных генов, полученных в результате слияния доминантного маркера положительного отбора с маркером отрицательного отбора. См., например, Riddell et al., Патент США № 6,040,177, в столбцах 14-17.

В некоторых воплощениях клетки инкубируют и/или культивируют до или в связи с генной инженерией. Стадии инкубации могут включать культивацию, культивирование, стимуляцию, активацию и/или размножение. Инкубацию и/или конструирование можно проводить в сосуде для культивирования, таком как блок, камера, лунка, колонка, пробирка, набор трубок, клапан, флакон, культуральная тарелка, мешок или другой контейнер для культивации или культивирования клеток. В некоторых воплощениях композиции или клетки инкубируют в присутствии стимулирующих условий или стимулирующего агента. Такие условия включают условия, предназначенные для того, чтобы индуцировать пролиферацию, экспансию, активацию и/или выживание клеток в популяции, имитировать воздействие антигена и/или праймировать клетки для генной инженерии, такой как введение рекомбинантного антигенного рецептора. В некоторых воплощениях один или несколько стадий инкубации могут быть выполнены с использованием качающего биореактора, такого как биореактор WAVE™ (GE Healthcare) или BIOSTAT® RM (Sartorius). В некоторых воплощениях один или несколько стадий инкубации могут быть выполнены с использованием статического биореактора или инкубационной камеры. В конкретных воплощениях в композицию может быть добавлен агент против сдвига, например, полоксамер, если используется качающий биореактор для одной или нескольких стадий инкубации.

Условия могут включать одну или несколько из конкретных сред, температуры, содержания кислорода, содержания диоксида углерода, времени, агентов, например, питательных веществ, аминокислот, антибиотиков, ионов и/или стимулирующих факторов, таких как цитокины, хемокины, антигены, партнеры связывания, химерные белки, рекомбинантные растворимые рецепторы и любые другие агенты, предназначенные для активации клеток. В некоторых аспектах клетки инкубируют в

присутствии одного или нескольких цитокинов, и в некоторых воплощениях можно использовать коктейль цитокинов, например, как описано в публикации патентной заявки РСТ № WO 2015/157384, которая включена ссылкой. В некоторых воплощениях клетки инкубируют с одним или несколькими цитокинами и/или коктейлем цитокинов до, одновременно или после трансдукции.

В некоторых воплощениях стимулирующие условия или агенты включают один или несколько агентов, например, лиганд, который способен активировать внутриклеточный сигнальный домен комплекса TCR. В некоторых аспектах агент включает или инициирует внутриклеточный сигнальный каскад TCR/CD3 в Т-клетке. Такие агенты могут включать антитела, такие как антитела, специфичные для компонента TCR, например, анти-CD3. В некоторых воплощениях стимулирующие состояния включают один или несколько агентов, например, лиганд, который способен стимулировать костимулирующий рецептор, например, анти-CD28. В некоторых воплощениях такие агенты и/или лиганды могут быть связаны с твердой подложкой, такой как шарик, и/или одним или несколькими цитокинами. Необязательно, способ экспансии может дополнительно включать стадию добавления анти-CD3 и/или анти-CD28-антитела к культуральной среде (например, в концентрации, по меньшей мере, около 0,5 нг/мл). В некоторых воплощениях стимулирующие агенты включают IL-2 и/или IL-15, например, IL-2 в концентрации, по меньшей мере, около 10 единиц/мл.

В некоторых аспектах инкубацию проводят в соответствии с методами, такими как те, которые описаны в патенте США № 6,040,177, выданном Riddell et al., Klebanoff et al. (2012) J Immunother. 35(9): 651–660, Terakura et al. (2012) Blood. 117:72–82, и/или Wang et al. (2012) J Immunother. 35(9):689-701. В некоторых аспектах преобразование осуществляется с использованием системы, устройства, аппарата и/или способа, описанных в публикации патентной заявки РСТ № WO 2016/073602 или US 2016/0122782, содержание которых включено ссылкой во всей их полноте. В некоторых воплощениях трансдукция выполняется в соответствии со способами, описанными в публикации патентной заявки РСТ № WO 2015/164675, содержание которой включено ссылкой во всей ее полноте.

В некоторых воплощениях Т-клетки размножают путем добавления к инициирующей культуру композиции, питающей клетки, такой как неделящиеся моноклеарные клетки периферической крови (РВМС) (например, так, чтобы получающаяся популяция клеток содержала, по меньшей мере, около 5, 10, 20 или 40 или более фидерных клеток РВМС для каждого Т-лимфоцита в исходной популяции, которая будет размножена); и инкубирование культуры (например, в течение времени, достаточного для увеличения числа Т-клеток). В некоторых аспектах неделящиеся

фидерные клетки могут содержать гамма-облученные фидерные клетки РВМС. В некоторых воплощениях РВМС облучают гамма-лучами в диапазоне от около 3000 до 3600 рад для предотвращения деления клеток. В некоторых аспектах питающие клетки добавляют в культуральную среду перед добавлением популяций Т-клеток.

В некоторых воплощениях стимулирующие условия включают температуру, подходящую для роста человеческих Т-лимфоцитов, например, по меньшей мере, около 25 градусов Цельсия, обычно, по меньшей мере, около 30 градусов и, в целом или около 37 градусов Цельсия. Необязательно, инкубация может дополнительно включать добавление неделящихся EBV-трансформированных лимфобластоидных клеток (LCL) в качестве фидерных клеток. LCL могут быть облучены гамма-лучами в диапазоне от около 6000 до 10000 рад. Фидерные клетки LCL в некоторых аспектах представлены в любом подходящем количестве, таком как отношение фидерных клеток LCL к исходным Т-лимфоцитам, по меньшей мере, около 10:1.

Способы обработки образца

В некоторых воплощениях способы включают способ обработки образца афереза, включающий (а) доставку в охлажденной среде в хранилище образца афереза, взятого у донора; и (b) криогенное хранение образца афереза в хранилище. Способы могут дополнительно включать, в соответствии с некоторыми воплощениями, обработку множества образцов афереза, включающую (а) доставку в охлажденной среде в хранилище множества образцов афереза, каждый из которых взят от одного или разных доноров, и отправлены либо в одно и то же время или в разное время; и (b) криогенное хранение каждого из образцов афереза в хранилище.

В некоторых воплощениях образец афереза представляет собой кровь, взятую у донора в соответствии с воплощениями, описанными выше.

В некоторых воплощениях температура охлаждаемой транспортировочной среды составляет от -80°C до 0°C . В некоторых воплощениях температура охлаждаемой транспортировочной среды составляет от -80°C до -20°C . В некоторых воплощениях температура охлаждаемой транспортировочной среды составляет от -20°C до 0°C .

В некоторых воплощениях средство, где отбирается образец донора для афереза, и средство хранения связаны друг с другом, но это не требуется во всех воплощениях. В некоторых воплощениях средства связаны друг с другом посредством донора или другого объекта, который решает собрать образец афереза в хранилище и хранить образец афереза в хранилище. В некоторых воплощениях учреждение для сбора и учреждение для хранения могут совместно использовать одно и то же физическое местоположение. В некоторых воплощениях учреждение для сбора и хранилище могут быть расположены в

разных местах, таких как разные государства или разные штаты.

В некоторых воплощениях хранилище является центральным хранилищем или общим репозиторным хранилищем, в котором хранятся пробы афереза разных пациентов, полученные в разных хранилищах. В некоторых воплощениях центральное или общее репозиторное хранилище будет криогенно хранить образцы афереза перед отправкой этих образцов в одно или несколько производственных объектов. В некоторых воплощениях центральное или общее репозиторное хранилище и производственные объекты связаны друг с другом. В некоторых воплощениях центральное или общее репозиторное хранилище и производственные объекты не связаны друг с другом. В некоторых воплощениях все образцы от донора отправляются на производственный объект из центрального или общего репозиторного хранилища. В других воплощениях некоторые образцы от донора отправляются на производственный объект, а другие образцы хранятся в центральном или общем хранилище. В некоторых воплощениях все образцы от донора отправляются на один и тот же производственный объект из центрального или общего репозиторного хранилища. В других воплощениях некоторые образцы от донора отправляются из центрального или общего репозиторного хранилища в один производственный объект, а другие образцы от донора отправляются в другой производственный объект.

В некоторых воплощениях тип или типы клеток обогащаются и/или выделяются из образца афереза перед отправкой. В других случаях клетки могут быть обогащены и/или выделены из образца афереза после доставки. Например, клетки могут быть обогащены и/или выделены в соответствии с воплощениями, описанными выше.

В некоторых воплощениях образец афереза или обогащенные и/или выделенные клетки анализируют перед отправкой. В некоторых воплощениях образец афереза или обогащенные и/или выделенные клетки анализируют после отправки и перед хранением в криогенном состоянии. Образец афереза или обогащенные и/или выделенные клетки могут быть проанализированы в соответствии с воплощениями, описанными выше.

В некоторых воплощениях часть или части афереза, или обогащенной и/или выделенной клеточной популяции, или сконструированной популяции или композиции Т-клеток удаляют до криогенного замораживания афереза, или обогащенной и/или выделенной клеточной популяции, или сконструированной популяции или композиции Т-клеток. В некоторых воплощениях удаляемая порция или порции анализируются в любой момент времени, включая, например, до или после криогенного замораживания афереза, или обогащенную и/или изолированную популяцию клеток, или сконструированную популяцию или композицию Т-клеток.

В некоторых воплощениях образец афереза или клетки объединяют с замораживающим раствором перед отправкой. В некоторых воплощениях образец афереза или клетки объединяют с замораживающим раствором после отправки и перед хранением в криогенном состоянии. Среда для замораживания может быть таким же, как среда для замораживания в воплощениях, описанных выше.

В некоторых воплощениях образец афереза разделяют на 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более чем 10 отдельных контейнеров до или после объединения с замораживающим раствором для криогенного замораживания. В некоторых воплощениях образец афереза перед отправкой делят на 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более 10 отдельных контейнеров. В некоторых воплощениях образец афереза делится на 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более 10 отдельных контейнеров после отправки. В некоторых воплощениях любое количество отдельных контейнеров, несущих разделенный аферез, криогенно замораживают до или после отправки.

В некоторых воплощениях образцы афереза делятся на 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более 10 отдельных контейнеров, которые криогенно хранятся в хранилище. В некоторых воплощениях хранилище является центральным или общим хранилищем хранилища. В некоторых воплощениях хранилище отправляет любое количество отдельных контейнеров, несущих разделенный аферез, в один или несколько производственных объектов.

В некоторых воплощениях один или несколько контейнеров, в которых образец афереза хранился в криогенном состоянии, извлекаются из криогенного хранилища, при этом оставшиеся контейнеры хранятся в криогенном хранилище. В некоторых воплощениях клетки в одном или нескольких контейнерах, извлеченных из криогенного хранилища, оттаивают. В некоторых воплощениях оттаивающие клетки сконструированы. В некоторых воплощениях оттаявшие клетки сконструированы для экспрессии молекулы CAR. В некоторых воплощениях один или несколько последующих контейнеров, в которых образец афереза хранился в криогенном хранилище, извлекаются из криогенного хранилища, в то время как оставшиеся контейнеры хранятся в криогенном хранилище. В некоторых воплощениях клетки в одном или нескольких последующих контейнерах, извлеченных из криогенного хранилища, оттаивают. В некоторых воплощениях оттаиваемые клетки сконструированы. В некоторых воплощениях размороженные клетки сконструированы так, чтобы продуцировать клетки, экспрессирующие молекулу CAR, сходную или отличную от ранее размороженных клеток. В некоторых воплощениях контейнеры, в которых образец афереза хранился в криогенных условиях, хранятся в криогенных хранилищах в течение различных отрезков времени.

В некоторых воплощениях образец афереза или клетки перед отправкой охлаждают до температуры от -80°C до 0°C . Образец афереза или клетки могут быть охлаждены способом согласно воплощениям, описанным выше. В некоторых воплощениях перед охлаждением клеток клетки промывают способом согласно воплощениям, описанным выше.

В некоторых воплощениях образец афереза или клетки криогенно замораживают до температуры от -210°C до $-^{\circ}\text{C}$ перед отправкой. В некоторых воплощениях образец афереза или клетки криогенно замораживают после отправки. Образец афереза или клетки могут быть криогенно заморожены способом согласно воплощениям, описанным выше. В некоторых воплощениях перед криогенным замораживанием клеток клетки промывают способом согласно воплощениям, описанным выше.

В некоторых воплощениях образец афереза или клетки хранят в криогенных условиях при температуре от -210°C до -80°C . Например, образец афереза или клетки могут храниться криогенным способом в соответствии с воплощениями, описанными выше, такими как в паровой фазе резервуара для хранения жидкого азота, и, например, в течение периода хранения от 1 дня до 12 лет. В некоторых воплощениях клетки хранятся или хранятся в течение периода времени, превышающего или равного 12 часам, 24 часам, 36 часам или 48 часам. В некоторых воплощениях клетки хранятся или хранятся в течение периода времени, превышающего или равного 1 неделе, 2 неделям, 3 неделям или 4 неделям. В некоторых воплощениях клетки помещаются в долговременное хранилище или долговременное банкирование. В некоторых аспектах клетки хранятся в течение периода времени, большего или равного 1 месяцу, 2 месяцам, 3 месяцам, 4 месяцам, 5 месяцам, 6 месяцам, 7 месяцам, 8 месяцам, 9 месяцам, 10 месяцам, 11 месяцам, 1 году, 2 годам, 3 годам, 4 годам, 5 годам, 6 годам, 7 годам, 8 годам, 9 годам, 10 годам, 11 годам, 12 годам, 13 годам, 14 годам, 15 годам, 16 годам, 17 годам, 18 годам, 19 годам, 20 годам, 25 годам, 30 годам, 35 годам, 40 годам или более.

В некоторых воплощениях образец афереза или клетки хранят в криогенных условиях при температуре от -210 до -80°C . В некоторых воплощениях температура, при которой хранятся клетки, не превышает около -100°C , или -95°C , или -90°C , или -85°C , или -80°C , или -75°C . С или -70°C , или -65°C , или -60°C .

В некоторых воплощениях после периода хранения образец афереза или клетки оттаивают. Например, образец афереза или клетки можно размораживать в соответствии с воплощениями, описанными выше. Также, в соответствии с некоторыми воплощениями, после периода хранения процент жизнеспособных клеток составляет от 24% до 100%. Процент жизнеспособных клеток может быть определен, например, согласно

воплощениям, описанным выше.

В некоторых воплощениях образец афереза или обогащенные клетки анализируют после сбора и перед отправкой. В некоторых воплощениях образец афереза или обогащенные клетки анализируют после доставки и перед криогенным хранением. В некоторых воплощениях образец афереза или обогащенные клетки анализируют после периода хранения. В некоторых воплощениях после анализа образец афереза или клетки могут быть модифицированы. В некоторых воплощениях модификация происходит перед отправкой. В некоторых воплощениях модификация происходит после доставки и перед криогенным хранением. В некоторых воплощениях модификация происходит после криогенного хранения. В таких воплощениях модификация называется «посткриогенная модификация». Анализ и/или модификация образца афереза или клеток может быть выполнена в соответствии с воплощениями, описанными выше.

Композиции и составы

Также предлагаются композиции, включающие клетки, в том числе фармацевтические композиции и составы, такие как композиции в форме единичной дозы, включающие количество клеток для введения в данной дозе или их фракции. Фармацевтические композиции и составы обычно включают один или несколько необязательных фармацевтически приемлемых носителей или наполнителей. В некоторых воплощениях композиция включает, по меньшей мере, один дополнительный терапевтический агент.

Термин «фармацевтическая композиция» относится к составу, который находится в такой форме, которая позволяет биологической активности активного ингредиента, содержащегося в нем, быть эффективным и который не содержит дополнительных компонентов, которые являются неприемлемо токсичными для объекта, которому композиция будет вводиться.

«Фармацевтически приемлемый носитель» относится к ингредиенту в фармацевтической композиции, отличному от активного ингредиента, который нетоксичен для объекта. Фармацевтически приемлемый носитель включает, без ограничения указанным, буфер, наполнитель, стабилизатор или консервант.

В некоторых аспектах выбор носителя частично определяется конкретной клеткой и/или способом введения. Соответственно, существует множество подходящих составов. Например, фармацевтическая композиция может содержать консерванты. Подходящие консерванты могут включать, например, метилпарабен, пропилпарабен, бензоат натрия и хлорид бензалкония. В некоторых аспектах используется смесь двух или более консервантов. Консервант или их смеси обычно присутствуют в количестве от около

0,0001% до около 2% от общей массы композиции. Носители описаны, например, в Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980). Фармацевтически приемлемые носители обычно нетоксичны для реципиентов при используемых дозировках и концентрациях и включают, без ограничения указанным: буферы, такие как фосфат, цитрат и другие органические кислоты; антиоксиданты, включая аскорбиновую кислоту и метионин; консерванты (такие как хлорид октадецилдиметилбензиламмония; хлорид гексаметония; хлорид бензалкония; хлорид бензетония; фенол, бутил или бензиловый спирт; алкилпарабены, такие как метил или пропилпарабен; катехол; резорцинол; циклогексанол; 3-пентанол; и м-крезол); низкомолекулярные (менее чем около 10 остатков) полипептиды; белки, такие как сывороточный альбумин, желатин или иммуноглобулины; гидрофильные полимеры, такие как поливинилпирролидон; аминокислоты, такие как глицин, глутамин, аспарагин, гистидин, аргинин или лизин; моносахариды, дисахариды и другие углеводы, включая глюкозу, маннозу или декстрины; хелатообразующие агенты, такие как EDTA; сахара, такие как сахарозу, маннит, трегалозу или сорбит; солеобразующие противоионы, такие как натрий; комплексы с металлами (например, комплексы Zn-белок); и/или неионные поверхностно-активные вещества, такие как полиэтиленгликоль (ПЭГ).

В некоторых аспектах в композиции включены буферные агенты. Подходящие буферные агенты включают, например, лимонную кислоту, цитрат натрия, фосфорную кислоту, фосфат калия и различные другие кислоты и соли. В некоторых аспектах используется смесь двух или более буферных агентов. Буферный агент или их смеси обычно присутствуют в количестве от около 0,001% до около 4% от общей массы композиции. Способы приготовления вводимых фармацевтических композиций известны. Примерные способы описаны более подробно, например, в Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Lippincott Williams & Wilkins; 21st ed. (May 1, 2005).

Композиции могут включать водные растворы. Состав или композиция может также содержать более одного активного ингредиента, полезного для конкретного показания, заболевания или состояния, подвергаемого лечению клетками, предпочтительно с активностями, комплементарными клеткам, где соответствующие активности не оказывают неблагоприятного влияния друг на друга. Такие активные ингредиенты подходящим образом присутствуют в комбинации в количествах, которые эффективны для предполагаемой цели. Таким образом, в некоторых воплощениях фармацевтическая композиция дополнительно включает другие фармацевтически активные агенты или лекарственные средства, такие как химиотерапевтические агенты, например, аспарагиназа, бусульфан, карбоплатин, цисплатин, даунорубицин,

доксорубицин, фторурацил, гемцитабин, гидроксимочевина, метотрексат, паклитаксел, риниткс, рибаксакс и/или винкристин.

В некоторых воплощениях композиция включает клетки в количестве, эффективном для снижения бремени заболевания или состояния, и/или в количестве, которое не приводит к CRS или тяжелому CRS у объекта и/или для воздействия на любой из других исходов способов, описанных в настоящем документе.

Фармацевтическая композиция в некоторых воплощениях содержит клетки в количествах, эффективных для лечения или предотвращения заболевания или состояния, таких как терапевтически эффективное или профилактически эффективное количество. Терапевтическую или профилактическую эффективность в некоторых воплощениях контролируют путем периодической оценки подвергнутых лечению объектов. Искомая доза может быть доставлена однократным болюсным введением клеток, множественным болюсным введением клеток или непрерывным инфузионным введением клеток.

Клетки и композиции могут вводиться с использованием стандартных методов введения, составов и/или устройств. Введение клеток может быть аутологичным или гетерологичным. Например, иммунореактивные клетки или предшественники могут быть получены от одного объекта и введены одному и тому же объекту или другому совместимому объекту. Иммунореактивные клетки периферической крови или их потомство (например, *in vivo*, *ex vivo* или полученные *in vitro*) можно вводить посредством локализованной инъекции, включая введение катетером, системную инъекцию, локализованную инъекцию, внутривенную инъекцию или парентеральное введение. Когда вводят терапевтическую композицию (например, фармацевтическую композицию, содержащую генетически модифицированную иммунореактивную клетку), она, как правило, будет составлена в форме для инъекций в виде единичной дозы (раствор, суспензия, эмульсия).

Композиции включают составы для перорального, внутривенного, внутрибрюшинного, подкожного, легочного, трансдермального, внутримышечного, интраназального, буккального, сублингвального или суппозиторного введения. В некоторых воплощениях клеточные популяции вводят парентерально. Используемый в данном документе термин «парентеральный» включает внутривенное, внутримышечное, подкожное, ректальное, вагинальное и внутрибрюшинное введение. В некоторых воплощениях клетки вводят объекту с использованием периферической системной доставки путем внутривенной, внутрибрюшинной или подкожной инъекции.

Композиции в некоторых воплощениях представлены в виде стерильных жидких препаратов, например, изотонических водных растворов, суспензий, эмульсий, дисперсий

или вязких композиций, которые в некоторых аспектах могут быть забуферены до выбранного pH. Жидкие препараты обычно легче приготовить, чем гели, другие вязкие композиции и твердые композиции. Кроме того, жидкие композиции несколько удобнее вводить, особенно инъекцией. Вязкие композиции, с другой стороны, могут быть составлены в пределах соответствующего диапазона вязкости, чтобы обеспечить более длительные периоды контакта с конкретными тканями. Жидкие или вязкие композиции могут содержать носители, которые могут быть растворителем или диспергирующей средой, содержащей, например, воду, физиологический раствор, фосфатно-солевой буферный раствор, полиол (например, глицерин, пропиленгликоль, жидкий полиэтиленгликоль) и их подходящие смеси.

Стерильные растворы для инъекций могут быть получены путем включения клеток в растворитель, такой как в смеси с подходящим носителем, разбавителем или наполнителем, таким как стерильная вода, физиологический раствор, глюкоза, декстроза или тому подобное. Композиции могут содержать вспомогательные вещества, такие как смачивающие, диспергирующие или эмульгирующие агенты (например, метилцеллюлозу), pH-буферные агенты, гелеобразующие или повышающие вязкость добавки, консерванты, ароматизаторы и/или красители, в зависимости от пути введения и искомого препарата. Для подготовки подходящих препаратов можно обратиться к стандартам.

Могут быть добавлены различные добавки, которые повышают стабильность и стерильность композиций, включая антимикробные консерванты, антиоксиданты, хелатообразующие агенты и буферы. Предотвращение действия микроорганизмов может быть обеспечено различными антибактериальными и противогрибковыми средствами, например, парабенами, хлорбутанолом, фенолом и сорбиновой кислотой. Длительная абсорбция инъектируемой фармацевтической формы может быть достигнута путем применения агентов, замедляющих абсорбцию, например, моностеарата алюминия и желатина.

Составы, используемые для введения *in vivo*, обычно являются стерильными. Стерильность может быть легко достигнута, например, путем фильтрации через стерильные фильтрующие мембраны.

В некоторых воплощениях терапевтическая композиция Т-клеток содержит от около 10 миллионов клеток на мл до около 70 миллионов клеток на мл или от около 10 миллионов жизнеспособных клеток на мл до около 70 миллионов жизнеспособных клеток на мл. В некоторых воплощениях терапевтическая композиция Т-клеток содержит от около 15 миллионов клеток или жизнеспособных клеток на мл до около 60 миллионов

клеток или жизнеспособных клеток на мл. В некоторых воплощениях композиция Т-клеток содержит более 10 миллионов клеток или жизнеспособных клеток на мл. В некоторых воплощениях терапевтическая композиция Т-клеток содержит более 15 миллионов клеток или более 15 миллионов клеток на мл.

В некоторых воплощениях эта заявка обеспечивает изделие, содержащее контейнер, который содержит терапевтическую композицию Т-клеток. В некоторых воплощениях изделие дополнительно содержит информацию, указывающую, что контейнер содержит целевое количество единиц терапевтической композиции Т-клеток. В некоторых воплощениях изделие содержит несколько контейнеров, причем каждый из контейнеров содержит единичную дозу, включающую целевое количество единиц композиции Т-клеток. В некоторых воплощениях контейнеры содержат от около 10 миллионов клеток или жизнеспособных клеток на мл до около 70 миллионов клеток или жизнеспособных клеток на мл, от около 15 миллионов клеток или жизнеспособных клеток до около 60 миллионов клеток или жизнеспособных клеток на мл, больше чем 10 миллион клеток или жизнеспособных клеток на мл, более 15 миллионов клеток или жизнеспособных клеток на мл или их комбинации. В некоторых воплощениях композиция дополнительно содержит криопротектор и/или изделие дополнительно включает инструкции по размораживанию композиции перед введением объекту.

В некоторых воплощениях клетки суспендируют в замораживающем растворе, например, после стадии промывания для удаления плазмы и тромбоцитов. В некоторых аспектах может быть использовано любое из множества известных решений и параметров замораживания. Один пример включает использование PBS, содержащего 20% DMSO и 8% HSA, или другую подходящую среду для замораживания клеток. Затем его разбавляют 1:1 средой, так что конечная концентрация DMSO и HSA составляет 10% и 4%, соответственно.

В некоторых аспектах может быть использовано любое из множества известных решений и параметров замораживания. В некоторых воплощениях образец клетки может содержать среду для криоконсервации или витрификации или раствор, содержащий криопротектор. Подходящие криопротекторы включают, без ограничения указанным, DMSO, глицерин, гликоль, пропиленгликоль, этиленгликоль, пропандиол, полиэтиленгликоль (PEG), 1,2-пропандиол (PROH) или их смесь. В некоторых примерах раствор для криоконсервации может содержать один или несколько не проникающих в клетки криоконсервантов, включая, без ограничения указанным, поливинилпирролидон, гидроксипропилкрахмал, полисахарид, моносахарид, альгинат, трегалозу, рафмосу, декстран, человеческий сывороточный альбумин, фикоил, липопротеины, поливинилпирролидон,

гидроксиэтилкрахмал, аутологичную плазму или их смесь. В некоторых воплощениях клетки суспендируют в замораживающем растворе с конечной концентрацией криопротектора от около 1% до около 20%, от около 3% до около 9% или от около 6% до около 9% по объему. В некоторых воплощениях конечная концентрация криопротектора в замораживающем растворе составляет около 3%, около 4%, около 5%, около 5,5%, около 6%, около 6,5%, около 7%, около 7,5%, около 8%, около 8,5%, около 9%, около 9,5% или около 10% по объему.

В некоторых воплощениях криопротектор представляет собой DMSO. В конкретных воплощениях клетки суспендируют в замораживающем растворе с конечной концентрацией DMSO от около 1% до около 20%, от около 3% до около 9% или от около 6% до около 9% по объему. В некоторых воплощениях конечная концентрация DMSO в замораживающем растворе составляет около 3%, около 4%, около 5%, около 5,5%, около 6%, около 6,5%, около 7%, около 7,5%, около 8%, около 8,5%, около 9%, около 9,5% или около 10% по объему.

В некоторых воплощениях клетки суспендируют в замораживающем растворе с плотностью от около 1×10^6 клеток/мл до около 1×10^8 клеток/мл, от около 1×10^6 клеток/мл до около 2×10^7 клеток/мл, от около 1×10^7 клеток/мл до около 5×10^7 клеток/мл или от около 1×10^7 клеток/мл до 5×10^7 клеток/мл. В некоторых воплощениях клетки суспендируют в замораживающем растворе с плотностью около 1×10^6 клеток/мл, около 2×10^6 клеток/мл, около 5×10^6 клеток/мл, около 1×10^7 клеток/мл, около $1,5 \times 10^7$ клеток/мл, около 2×10^7 клеток/мл, около $2,5 \times 10^7$ клеток/мл, около $2,5 \times 10^7$ клеток/мл, около $2,5 \times 10^7$ клеток/мл, около 3×10^7 клеток/мл, около $3,5 \times 10^7$ клеток/мл, около 4×10^7 клеток/мл, около $4,5 \times 10^7$ клеток/мл или около 5×10^7 клеток/мл. В некоторых воплощениях клетки суспендируют в замораживающем растворе с плотностью от около $1,5 \times 10^7$ клеток/мл до около 6×10^7 клеток/мл. В определенных воплощениях клетки суспендируют в замораживающем растворе с плотностью от около 5×10^6 клеток/мл до около 150×10^6 клеток/мл. В определенных воплощениях клетки суспендируют в замораживающем растворе с плотностью, по меньшей мере, около 1×10^7 клеток/мл. В конкретных воплощениях клетки суспендируют в замораживающем растворе с плотностью, по меньшей мере, около $1,5 \times 10^7$ клеток/мл. В некоторых воплощениях клетки являются жизнеспособными клетками.

В конкретных воплощениях клетки суспендируют в замораживающем растворе с плотностью от около $0,1 \times 10^6$ клеток/мл до около 5000×10^6 клеток/мл, от или около 1×10^6 клеток/мл до около 500×10^6 клеток/мл, между или между около 5×10^6 клеток/мл и около 150×10^6 клеток/мл, между или между около 10×10^6 клеток/мл и около 70×10^6

клеток/мл, или между или между около 15×10^6 клеток/мл и около 60×10^6 клеток/мл, в каждом случае включительно. В некоторых воплощениях клетки суспендируют в замораживающем растворе с плотностью от около 1×10^6 клеток/мл до около 1×10^8 клеток/мл, от около 1×10^6 клеток/мл до около 2×10^7 клеток/мл, от около 1×10^7 клеток/мл до около 5×10^7 клеток/мл или от около 1×10^7 клеток/мл до 5×10^7 клеток/мл, в каждом случае включительно. В некоторых воплощениях клетки суспендируют в замораживающем растворе с плотностью около 1×10^6 клеток/мл, около 2×10^6 клеток/мл, около 5×10^6 клеток/мл, около 1×10^7 клеток/мл, около $1,5 \times 10^7$ клеток/мл, около 2×10^7 клеток/мл, около $2,5 \times 10^7$ клеток/мл, около $2,5 \times 10^7$ клеток/мл, около $2,5 \times 10^7$ клеток/мл, около 3×10^7 клеток/мл, около $3,5 \times 10^7$ клеток/мл, около 4×10^7 клеток/мл, около $4,5 \times 10^7$ клеток/мл или около 5×10^7 клеток/мл. В некоторых воплощениях клетки суспендируют в замораживающем растворе с плотностью от около $1,5 \times 10^7$ клеток/мл до около 6×10^7 клеток/мл включительно. В определенных воплощениях клетки суспендируют в замораживающем растворе с плотностью, по меньшей мере, около 1×10^7 клеток/мл. В конкретных воплощениях клетки суспендируют в замораживающем растворе с плотностью, по меньшей мере, около $1,5 \times 10^7$ клеток/мл. В некоторых воплощениях клетки являются жизнеспособными клетками.

В некоторых воплощениях перенос в криоконсервирующую среду связан с одним или несколькими стадиями обработки, которые могут включать промывание образца, например, клеток и/или композиции сконструированных клеток, например, для удаления носителя и/или замены клеток в соответствующем буфере для криоконсервации или носитель для последующего замораживания. В некоторых воплощениях перенос в криоконсервирующую среду полностью автоматизирован на уровне клинического масштаба в закрытой и стерильной системе. В определенных воплощениях перенос в криоконсервирующую среду осуществляют с использованием системы CliniMACS (Miltenyi Biotec).

В некоторых воплощениях клетки замораживают, например, криоконсервируют либо до, во время или после указанных способов обработки и/или конструирования клеток. В некоторых воплощениях стадия замораживания и последующего оттаивания удаляет гранулоциты и, в некоторой степени, моноциты в клеточной популяции. Клетки могут быть заморожены до -80°C со скоростью 1° в минуту и храниться в паровой фазе резервуара для хранения жидкого азота. В некоторых воплощениях композиция заключена в пакет, подходящий для криоконсервации (например, CryoMacs[®] Freezing Bags, Miltenyi Biotec). В некоторых воплощениях композиция заключена во флакон, подходящий для криоконсервации (например, CellSeal[®] Vials, Cook Regentec).

Подходящие контейнеры включают, например, бутылки, флаконы, шприцы и гибкие пакеты, такие как пакеты для инфузии. В конкретных воплощениях контейнеры представляют собой пакеты, например, гибкие пакеты, такие как пакеты, подходящие для инфузии клеток объектам, например, гибкие пластиковые или ПВХ-пакеты, и/или пакеты для внутривенного введения. Пакеты в некоторых воплощениях являются запечатываемыми и/или могут стерилизоваться, чтобы обеспечить стерильный раствор и доставку клеток и композиций. В некоторых воплощениях контейнеры, например, мешки, имеют вместимость около или около или, по меньшей мере, или около 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400, 500 или 1000 мл, например, между или около 10 и около или около 100 или между около или около 10 и около или около 500 мл, в каждом случае включительно. В некоторых воплощениях контейнеры, например, мешки, представляют собой и/или изготовлены из материала, который является стабильным и/или обеспечивает стабильное хранение и/или поддержание клеток при одной или нескольких различных температурах, таких как холодные температуры, например, ниже при или около или около или около -20°C , -80°C , -120°C , 135°C и/или температуры, подходящие для криоконсервации, и/или другие температуры, такие как температуры, подходящие для оттаивания клеток, и температура тела, например, при или около 37°C , например, для обеспечения возможности оттаивания, например, в месте расположения объекта или в месте лечения, например, у кровати, непосредственно перед лечением.

Контейнеры могут быть изготовлены из различных материалов, таких как стекло или пластик. В некоторых воплощениях контейнер имеет один или несколько отверстий, например, стерильные порты доступа, например, для соединения трубки или канюлирования с одной или несколькими трубками, например, для внутривенной или другой инфузии и/или для соединения с целью передачи в и из других контейнеров, таких как мешки для культивирования клеток и/или хранения или другие контейнеры. Типичные контейнеры включают пакеты для инфузии, пакеты для внутривенного раствора и флаконы, в том числе с пробками, прокалываемыми иглой для инъекции.

Настоящее изобретение не должно быть ограничено в объеме раскрытыми в данном документе воплощениями, которые предназначены в качестве отдельных иллюстраций отдельных аспектов изобретения, и любые, которые являются функционально эквивалентными, находятся в пределах объема изобретения. Различные модификации моделей и способов изобретения, в дополнение к описанным в данном документе, станут очевидными для специалистов в данной области техники из вышеприведенного описания и идей и аналогично предназначены для попадания в объем изобретения. Такие модификации или другие воплощения могут быть осуществлены без

отклонения от истинного объема и сущности изобретения.

Стимулирующие реагенты

В некоторых воплощениях инкубация композиции обогащенных клеток в стимулирующих условиях представляет собой или включает инкубацию и/или контакт композиции обогащенных клеток со стимулирующим реагентом, который способен активировать и/или размножать Т-клетки. В некоторых воплощениях стимулирующий реагент способен стимулировать и/или активировать один или несколько сигналов в клетках. В некоторых воплощениях один или несколько сигналов опосредуются рецептором. В конкретных воплощениях один или несколько сигналов представляют собой или связаны с изменением трансдукции сигнала и/или уровня или количества вторичных мессенджеров, например, сАМР и/или внутриклеточного кальция, с изменением количества, клеточной локализацией, подтверждением, фосфорилированием, убиквитинированием и/или усечением одного или нескольких клеточных белков и/или изменением клеточной активности, например, транскрипции, трансляции, деградации белка, морфологии клеток, состояния активации и/или деления клеток. В конкретных воплощениях стимулирующий реагент активирует и/или способен активировать один или несколько внутриклеточных сигнальных доменов одного или нескольких компонентов комплекса TCR и/или один или несколько внутриклеточных сигнальных доменов одной или нескольких костимулирующих молекул.

В некоторых воплощениях стимулирующий реагент содержит частицу, например, шарик, которая конъюгирована или связана с одним или несколькими агентами, например, биомолекулами, которые способны активировать и/или размножать клетки, например, Т-клетки. В некоторых воплощениях один или несколько агентов связаны с шариком. В некоторых воплощениях шарик является биосовместимым, то есть состоит из материала, который подходит для биологического применения. В некоторых воплощениях шарики нетоксичны для культивируемых клеток, например, культивируемых Т-клеток. В некоторых воплощениях шарики могут представлять собой любые частицы, которые способны прикреплять агенты таким образом, который обеспечивает взаимодействие между агентом и клеткой.

В некоторых воплощениях стимулирующий реагент содержит один или несколько агентов, которые способны активировать и/или приводить к размножению клеток, например, Т-клеток, которые связаны с шариком или иным образом прикреплены к шарiku, например, к поверхности шарика. В определенных воплощениях шарик представляет собой неклеточную частицу. В конкретных воплощениях шарик может включать коллоидную частицу, микросферу, наночастицу, магнитный шарик или тому

подобное. В некоторых воплощениях шарики представляют собой агарозные шарики. В определенных воплощениях шарики представляют собой сефарозные шарики.

В конкретных воплощениях стимулирующий реагент содержит шарики, которые являются монодисперсными. В некоторых воплощениях шарики, которые являются монодисперсными, включают дисперсии размеров, имеющих стандартное отклонение диаметра менее чем 5% друг от друга.

В некоторых воплощениях шарик содержит один или несколько агентов, таких как агент, который связан, конъюгирован или связан (прямо или косвенно) с поверхностью шарика. В некоторых воплощениях агент, как предполагается в настоящем документе, может включать, без ограничения указанным, РНК, ДНК, белки (например, ферменты), антигены, поликлональные антитела, моноклональные антитела, фрагменты антител, углеводы, липиды, лектины или любые другие биомолекулы с аффинностью к искомой мишени. В некоторых воплощениях искомой мишенью является Т-клеточный рецептор и/или компонент Т-клеточного рецептора. В определенных воплощениях искомой мишенью является CD3. В определенном воплощении искомой мишенью является костимулирующая молекула Т-клеток, например, CD28, CD137 (4-1-BB), OX40 или ICOS. Один или несколько агентов могут быть прикреплены прямо или косвенно к шарiku различными способами, известными и доступными в данной области. Присоединение может быть ковалентным, нековалентным, электростатическим или гидрофобным и может быть осуществлено с помощью различных средств крепления, включая, например, химических средств, механических средств или ферментативных средств. В некоторых воплощениях биомолекула (например, биотинилированное анти-CD3-антитело) может быть присоединена косвенно к шарiku через другую биомолекулу (например, анти-биотиновое антитело), которая непосредственно прикреплена к шарiku.

В некоторых воплощениях стимулирующий реагент содержит шарик и один или несколько агентов, которые непосредственно взаимодействуют с макромолекулой на поверхности клетки. В некоторых воплощениях шарик (например, парамагнитный шарик) взаимодействует с клеткой через один или несколько агентов (например, антитело), специфичных для одной или нескольких макромолекул на клетке (например, один или несколько белков клеточной поверхности). В некоторых воплощениях шарик (например, парамагнитный шарик) помечен первым агентом, описанным в настоящем документе, таким как первичное антитело (например, анти-биотиновое антитело) или другой биомолекулой, а затем вторым агентом, таким как вторичное антитело (например, биотинилированное анти-CD3-антитело) или другой второй биомолекулой (например, стрептавидином), посредством чего вторичное антитело или другая вторая биомолекула

специфически связывается с такими первичными антителами или другой биомолекулой на частице.

В некоторых воплощениях стимулирующий реагент содержит один или несколько агентов (например, антитело), которые прикреплены к шарiku (например, парамагнитному шарiku) и специфически связываются с одной или несколькими из следующих макромолекул на клетке (например, Т-клетке): CD2, CD3, CD4, CD5, CD8, CD25, CD27, CD28, CD29, CD31, CD44, CD45RA, CD45RO, CD54 (ICAM-1), CD127, MHC I, MHC II, CTLA-4, ICOS, PD-1, OX40, CD27L (CD70), 4-1BB (CD137), 4-1BBL, CD30L, LIGHT, IL-2R, IL-12R, IL-1R, IL-15R; IFN-гаммаR, TNF-альфаR, IL-4R, IL-10R, CD18/CD1a (LFA-1), CD62L (L-селектин), CD29/CD49d (VLA-4), лиганд Notch (например, Delta-подобный 1/4, Jagged 1/2 и т.д.), CCR1, CCR2, CCR3, CCR4, CCR5, CCR7 и CXCR3 или их фрагмент, включая соответствующие лиганды к этим макромолекулам или их фрагментам. В некоторых воплощениях средство (например, антитело), прикрепленное к шарiku, специфически связывается с одной или несколькими из следующих макромолекул на клетке (например, Т-клетке): CD28, CD62L, CCR7, CD27, CD127, CD3, CD4, CD8, CD45RA и/или CD45RO.

В некоторых воплощениях один или несколько агентов, прикрепленных к шарiku, представляют собой антитело. Антитело может включать поликлональное антитело, моноклональное антитело (включая полноразмерные антитела, которые имеют область Fc иммуноглобулина), композиции антител с полиэпитопной специфичностью, полиспецифические антитела (например, биспецифичные антитела, диатела и одноцепочечные молекулы, а также фрагменты антител (например, Fab, F(ab')₂ и Fv). В некоторых воплощениях стимулирующий реагент представляет собой фрагмент антитела (включая антигенсвязывающий фрагмент), например, фрагмент Fab, Fab'-SH, Fv, scFv или (Fab')₂. Понятно, что для рассматриваемых в данном документе антител можно использовать константные области любого изотипа, включая константные области IgG, IgM, IgA, IgD и IgE, и что такие константные области могут быть получены из любых видов человека или животных (например, из представителей мышиных). В некоторых воплощениях агент представляет собой антитело, которое связывается и/или распознает один или несколько компонентов Т-клеточного рецептора. В конкретных воплощениях агент представляет собой антитело против CD3. В определенных воплощениях агент представляет собой антитело, которое связывается и/или распознает корецептор. В некоторых воплощениях стимулирующий реагент содержит антитело против CD28. В некоторых воплощениях шарик имеет диаметр более около 0,001 мкм, более около 0,01 мкм, более около 0,1 мкм, более около 1,0 мкм, более около 10 мкм, более около 50 мкм,

более около 100 мкм или более около 1000 мкм и не более около 1500 мкм. В некоторых воплощениях шарик имеет диаметр от около 1,0 до около 500 мкм, от около 1,0 до около 150 мкм, от около 1,0 до около 30 мкм, от около 1,0 до около 10 мкм, от около 1,0 до около 5,0 мкм, от около 2,0 до около 5,0 мкм или от около 3,0 до около 5,0 мкм. В некоторых воплощениях шарик имеет диаметр от около 3 до около 5 мкм. В некоторых воплощениях шарик имеет диаметр, по меньшей мере, или, по меньшей мере, около или около 0,001 мкм, 0,01 мкм, 0,1 мкм, 0,5 мкм, 1,0 мкм, 1,5 мкм, 2,0 мкм, 2,5 мкм, 3,0 мкм, 3,5 мкм, 4,0 мкм., 4,5 мкм, 5,0 мкм, 5,5 мкм, 6,0 мкм, 6,5 мкм, 7,0 мкм, 7,5 мкм, 8,0 мкм, 8,5 мкм, 9,0 мкм, 9,5 мкм, 10 мкм, 12 мкм, 14 мкм, 16 мкм, 18 мкм или 20 мкм. В определенных воплощениях шарик имеет диаметр равный или около 4,5 мкм. В определенных воплощениях шарик имеет диаметр равный или около 2,8 мкм.

В некоторых воплощениях шарики имеют плотность более $0,001 \text{ г/см}^3$, более $0,01 \text{ г/см}^3$, более $0,05 \text{ г/см}^3$, более $0,1 \text{ г/см}^3$, более $0,5 \text{ г/см}^3$, более $0,6 \text{ г/см}^3$, более $0,7 \text{ г/см}^3$, более $0,8 \text{ г/см}^3$, более $0,9 \text{ г/см}^3$, более 1 г/см^3 , более $1,1 \text{ г/см}^3$, более $1,2 \text{ г/см}^3$, более $1,3 \text{ г/см}^3$, более $1,4 \text{ г/см}^3$, более $1,5 \text{ г/см}^3$, более 2 г/см^3 , более 3 г/см^3 , более 4 г/см^3 или более 5 г/см^3 . В некоторых воплощениях шарики имеют плотность от около $0,001 \text{ г/см}^3$ до около 100 г/см^3 , от около $0,01 \text{ г/см}^3$ до около 50 г/см^3 , от около $0,1 \text{ г/см}^3$ до около 10 г/см^3 , около $0,1 \text{ г/см}^3$ и около $0,5 \text{ г/см}^3$, около $0,5 \text{ г/см}^3$ и около 1 г/см^3 , около $0,5 \text{ г/см}^3$ и около $1,5 \text{ г/см}^3$, около 1 г/см^3 и около $1,5 \text{ г/см}^3$, около 1 г/см^3 и около 2 г/см^3 или около 1 г/см^3 и около 5 г/см^3 . В некоторых воплощениях шарики имеют плотность около $0,5 \text{ г/см}^3$, около $0,5 \text{ г/см}^3$, около $0,6 \text{ г/см}^3$, около $0,7 \text{ г/см}^3$, около $0,8 \text{ г/см}^3$, около $0,9 \text{ г/см}^3$, около $1,0 \text{ г/см}^3$, около $1,1 \text{ г/см}^3$, около $1,2 \text{ г/см}^3$, около $1,3 \text{ г/см}^3$, около $1,4 \text{ г/см}^3$, около $1,5 \text{ г/см}^3$, около $1,6 \text{ г/см}^3$, около $1,7 \text{ г/см}^3$, около $1,8 \text{ г/см}^3$, около $1,9 \text{ г/см}^3$ или около $2,0 \text{ г/см}^3$. В определенных воплощениях шарики имеют плотность около $1,6 \text{ г/см}^3$. В конкретных воплощениях шарики или частицы имеют плотность около $1,5 \text{ г/см}^3$. В определенных воплощениях частицы имеют плотность около $1,3 \text{ г/см}^3$.

В определенных воплощениях множество шариков имеет одинаковую плотность. В некоторых воплощениях однородная плотность включает стандартное отклонение плотности менее чем на 10%, менее чем на 5% или менее чем на 1% от средней плотности шариков.

В некоторых воплощениях шарики имеют площадь поверхности от около $0,001 \text{ м}^2$ на каждый грамм частиц ($\text{м}^2/\text{г}$) до около $1000 \text{ м}^2/\text{г}$, от около $0,010 \text{ м}^2/\text{г}$ до около $100 \text{ м}^2/\text{г}$, от около $0,1 \text{ м}^2/\text{г}$ до около $10 \text{ м}^2/\text{г}$, от около $0,1 \text{ м}^2/\text{г}$ до около $1 \text{ м}^2/\text{г}$, от около $1 \text{ м}^2/\text{г}$ до около $10 \text{ м}^2/\text{г}$, от около $10 \text{ м}^2/\text{г}$ до около $100 \text{ м}^2/\text{г}$, от около $0,5 \text{ м}^2/\text{г}$ до около $20 \text{ м}^2/\text{г}$, от около $0,5 \text{ м}^2/\text{г}$ до около $5 \text{ м}^2/\text{г}$ или от около $1 \text{ м}^2/\text{г}$ до около $4 \text{ м}^2/\text{г}$. В некоторых воплощениях

частицы или шарики имеют площадь поверхности от около $1 \text{ м}^2/\text{г}$ до около $4 \text{ м}^2/\text{г}$.

В некоторых воплощениях шарик содержит, по меньшей мере, один материал на или рядом с поверхностью шарика, который может быть спарен, связан или конъюгирован с агентом. В некоторых воплощениях шарик является поверхностно-функционализированным, то есть содержит функциональные группы, которые способны образовывать ковалентную связь со связываемой молекулой, например, полинуклеотидом или полипептидом. В конкретных воплощениях шарик содержит открытые поверхности карбоксильных, amino, гидроксильных, тозилых, эпоксидных и/или хлорметильных групп. В конкретных воплощениях шарики содержат открытую поверхность агарозы и/или сефарозы. В определенных воплощениях поверхность шарика содержит прикрепленные стимулирующие реагенты, которые могут связывать или присоединять связывающие молекулы. В конкретных воплощениях биомолекулы представляют собой полипептиды. В некоторых воплощениях шарики содержат экспонированный на поверхности протеин А, протеин G или биотин.

В некоторых воплощениях шарик реагирует в магнитном поле. В некоторых воплощениях шарик представляет собой магнитный шарик. В некоторых воплощениях магнитный шарик является парамагнитным. В конкретных воплощениях магнитный шарик является суперпарамагнитным. В некоторых воплощениях шарики не проявляют никаких магнитных свойств, если они не подвергаются воздействию магнитного поля.

В конкретных воплощениях шарик содержит магнитный сердечник, парамагнитный сердечник или суперпарамагнитный сердечник. В некоторых воплощениях магнитный сердечник содержит металл. В некоторых воплощениях металл может представлять собой, без ограничения указанным, железо, никель, медь, кобальт, гадолиний, марганец, тантал, цинк, цирконий или любые их комбинации. В некоторых воплощениях магнитный сердечник содержит оксиды металлов (например, оксиды железа), ферриты (например, ферриты марганца, ферриты кобальта, ферриты никеля и т.д.), гематит и сплавы металлов (например, CoTaZn). В некоторых воплощениях магнитный сердечник содержит один или несколько из числа феррита, металла, металлического сплава, оксида железа или диоксида хрома. В некоторых воплощениях магнитный сердечник содержит элементарное железо или его соединение. В некоторых воплощениях магнитный сердечник содержит один или несколько из числа магнетита (Fe_3O_4), маггемита ($\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$) или грейгита (Fe_3S_4). В некоторых воплощениях внутреннее ядро содержит оксид железа (например, Fe_3O_4).

В некоторых воплощениях шарик содержит магнитный, парамагнитный и/или суперпарамагнитный сердечник, который покрыт поверхностно

функционализированными оболочкой или покрытием. В некоторых воплощениях оболочка может содержать материал, который может включать, без ограничения указанным, полимер, полисахарид, диоксид кремния, жирную кислоту, белок, углерод, агарозу, сефарозу или их комбинацию. В некоторых воплощениях полимер может представлять собой полиэтиленгликоль, поли(молочно-гликолевую кислоту), полиглютаральдегид, полиуретан, полистирол или поливиниловый спирт. В некоторых воплощениях наружные оболочка или покрытие содержат полистирол. В конкретных воплощениях наружное покрытие является функционализированным на поверхности.

В некоторых воплощениях стимулирующий реагент содержит шарик, который содержит ядро из оксида металла (например, ядро из оксида железа) и оболочку, где ядро из оксида металла содержит, по меньшей мере, один полисахарид (например, декстран), и где оболочка содержит, по меньшей мере, один полисахарид (например, аминок-декстран), по меньшей мере, один полимер (например, полиуретан) и диоксид кремния. В некоторых воплощениях ядро из оксида металла представляет собой коллоидное ядро из оксида железа. В определенных воплощениях один или несколько агентов включают антитело или его антигенсвязывающий фрагмент. В конкретных воплощениях один или несколько агентов включают антитело против CD3 и антитело против CD28. В некоторых воплощениях стимулирующий реагент содержит антитело против CD3, антитело против CD28 и антитело против биотина. В некоторых воплощениях стимулирующий реагент содержит антитело против биотина. В некоторых воплощениях шарик имеет диаметр от около 3 до около 10 мкм. В некоторых воплощениях шарик имеет диаметр от около 3 до около 5 мкм. В определенных воплощениях шарик имеет диаметр около 3,5 мкм.

В некоторых воплощениях стимулирующий реагент содержит один или несколько агентов, которые прикреплены к шарiku, содержащему ядро из оксида металла (например, внутреннее ядро из оксида железа) и покрытие (например, защитное покрытие), причем покрытие содержит полистирол. В некоторых воплощениях шарики представляют собой монодисперсные, парамагнитные (например, суперпарамагнитные) шарики, содержащие парамагнитное (например, суперпарамагнитное) железное ядро, например, ядро, содержащее магнетит (Fe_3O_4) и/или маггемит ($\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$) с и полистирольные оболочку или покрытие. В некоторых воплощениях шарик является непористым. В некоторых воплощениях шарики содержат функционализированную поверхность, к которой прикреплен один или несколько агентов. В определенных воплощениях один или несколько агентов ковалентно связаны с шариками на поверхности. В некоторых воплощениях один или несколько агентов включают антитело или его антигенсвязывающий фрагмент. В некоторых воплощениях один или несколько

агентов включают антитело против CD3 и антитело против CD28. В некоторых воплощениях один или несколько агентов включают антитело против CD3 и/или антитело против CD28, а также антитело или его фрагмент антигена, способные связываться с меченым антителом (например, биотинилированным антителом), таким как меченое анти-CD3 антитело или анти-CD28 антитело. В определенных воплощениях шарики имеют плотность около $1,5 \text{ г/см}^3$ и площадь поверхности от около $1 \text{ м}^2/\text{г}$ до около $4 \text{ м}^2/\text{г}$. В конкретных воплощениях; шарики представляют собой монодисперсные суперпарамагнитные шарики, которые имеют диаметр около $4,5 \text{ мкм}$ и плотность около $1,5 \text{ г/см}^3$. В некоторых воплощениях шарики представляют собой монодисперсные суперпарамагнитные шарики, которые имеют средний диаметр около $2,8 \text{ мкм}$ и плотность около $1,3 \text{ г/см}^3$.

В некоторых воплощениях композицию обогащенных Т-клеток инкубируют со стимулирующим реагентом при соотношении шариков к клеткам равным или около 3:1, 2,5:1, 2:1, 1,5:1, 1,25:1, 1,2:1, 1,1:1, 1:1, 0,9:1, 0,8:1, 0,75:1, 0,67:1, 0,5:1, 0,3:1 или 0,2:1. В конкретных воплощениях отношение шариков к клеткам составляет от 2,5:1 до 0,2:1, от 2:1 до 0,5:1, от 1,5:1 до 0,75:1, от 1,25:1 до 0,8:1, от 1,1:1 и 0,9:1. В конкретных воплощениях отношение стимулирующего реагента к клеткам составляет около 1:1 или составляет 1:1.

Удаление стимулирующего реагента из клеток

В определенных воплощениях стимулирующий реагент удаляют и/или отделяют от клеток. Не желая быть связанными какой-либо теорией, конкретные воплощения предполагают, что связывание и/или ассоциация между стимулирующим реагентом и клетками могут, при некоторых обстоятельствах, уменьшаться со временем во время инкубации. В определенных воплощениях один или несколько агентов могут быть добавлены для уменьшения связывания и/или ассоциации между стимулирующим реагентом и клетками. В конкретных воплощениях изменение условий культивирования клеток, например, температуры среды pH, может уменьшить связывание и/или связь между стимулирующим реагентом и клетками. Таким образом, в некоторых воплощениях стимулирующий реагент может быть удален из инкубации, системы культивирования клеток и/или раствора отдельно от клеток, например, без удаления клеток из инкубации, системы культивирования клеток и/или раствора с тем же успехом.

Способы удаления из клеток стимулирующих реагентов (например, стимулирующих реагентов, которые являются или содержат частицы, такие как частицы шариков или намагничиваемые частицы) известны. В некоторых воплощениях можно использовать конкурирующие антитела, такие как немеченые антитела, которые,

например, связываются с первичным антителом стимулирующего реагента и изменяют его сродство к его антигену на клетке, тем самым делая возможным открепление. В некоторых случаях после отделения конкурирующие антитела могут оставаться связанными с частицей (например, частицей шариком), в то время как непрореагировавшее антитело вымывается или может быть смыто, а клетка свободна от выделения, отбора, обогащения и/или активации антитела. Примером такого реагента является DETACaBEAD (Friedl et al. 1995; Entschladen et al. 1997). В некоторых воплощениях частицы (например, частицы шариков) могут быть удалены в присутствии расщепляемого линкера (например, ДНК-линкера), посредством чего связанные с частицами антитела конъюгируются с линкером (например, CELlection, Dynal). В некоторых случаях линкерная область обеспечивает расщепляемый сайт для удаления частиц (например, частиц шариков) из клеток после выделения, например, путем добавления ДНКазы или другого высвобождающего буфера. В некоторых воплощениях другие ферментативные способы также могут быть использованы для высвобождения частицы (например, частицы шарика) из клеток. В некоторых воплощениях частицы (например, частицы шариков или намагничиваемые частицы) являются биоразлагаемыми.

В некоторых воплощениях стимулирующий реагент является магнитным, парамагнитным и/или суперпарамагнитным и/или содержит шарик, который является магнитным, парамагнитным и/или суперпарамагнитным, и стимулирующий реагент может быть удален из клеток путем воздействия на клетки магнитного поля. Примеры подходящего оборудования, содержащего магниты для генерации магнитного поля, включают DynaMag CTS (Thermo Fisher), Magnetic Separator (Takara) и EasySep Magnet (Stem Cell Technologies).

В конкретных воплощениях стимулирующий реагент удаляют или отделяют от клеток перед сбором и/или созданием состава сконструированных клеток, полученных способами, представленными в настоящем документе. В некоторых воплощениях стимулирующий реагент удаляют и/или отделяют от клеток перед конструированием, например, трансдукцией или трансфекцией клеток. В конкретных воплощениях стимулирующий реагент удаляют и/или отделяют от клеток после стадии конструирования клеток. В некоторых воплощениях стимулирующий реагент удаляют до культивирования клеток, например, до культивирования сконструированных, например, трансфицированных или трансдуцированных, клеток в условиях, способствующих пролиферации и/или размножению.

Примеры

Чтобы оценить эффекты криосохраняющего афереза, перед отбором или

выделением интересующей клеточной популяции отбирали пробы афереза через различные стадии процесса, предназначенного для получения сконструированных Т-клеток. Образцы оценивали в различных точках на жизнеспособность клеток, выход клеток по количеству, фенотипы клеток и активность клеток. Эти исследования были предназначены для определения того, повлияла ли криоконсервация материала для афереза (1) на фенотипические пропорции соответствующих популяций $CD4^+$ и $CD8^+$ Т-клеток, (2) повлияла на способность сортировать и отобрать соответствующие популяции Т-клеток после оттаивания и/или (3) влияет на здоровье клеток и/или функциональность.

В следующих примерах аферез относится к аферезу, полученному от донора. Криоконсервированный аферез относится к клеточному продукту, полученному в результате криоконсервации образца афереза после сбора, но до отбора любой интересующей клеточной популяции в образце. Покоящийся аферез относится к клеточному продукту, полученному на стадии, на которой после оттаивания криоконсервированного афереза ему давали возможность отдохнуть в течение определенного периода времени перед любыми дальнейшими стадиями обработки. Криоконсервированный выбранный материал относится к клеточному продукту, полученному в результате стадии, на которой после выделения представляющих интерес клеток ($CD4^+$ и $CD8^+$ Т-клетки в этих примерах) они подвергались стадии криоконсервации, после выделения.

Пример 1. Процессы получения терапевтических композиций $CD4^+$ и $CD8^+$ клеток, экспрессирующих анти-CD19 CAR

Сконструированные $CD4^+$ Т-клетки и сконструированные $CD8^+$ Т-клетки, каждая из которых экспрессирует один и тот же химерный антигенный рецептор CD19 (CAR), получали способом, который в общих чертах описан в данном документе. Как описано в Примере 2 ниже, клетки были получены либо способом, в котором отдельные композиции $CD4^+$ клеток и $CD8^+$ клеток были отобраны из выделенных PBMC из образцов лейкоафереза человека и криогенно заморожены. Отобранные композиции $CD4^+$ и $CD8^+$ впоследствии оттаивали и отдельно подвергали стадиям стимуляции, трансдукции и размножения. Второй примерный процесс включал дополнительную стадию криоконсервации перед стадией отбора.

Выделенные $CD4^+$ и $CD8^+$ клетки отдельно стимулировали в присутствии шариков, покрытых парамагнитным полистиролом, с присоединенными анти-CD3 и анти-CD28 антителами при соотношении шариков 1:1 к клетке. Клетки стимулировали в среде, содержащей IL-2, IL-15 и N-ацетилцистеин (NAC). Среда для $CD4^+$ клеток также включала IL-7.

После введения шариков $CD4^+$ и $CD8^+$ клетки отдельно трансдуцировали лентивирусным вектором, кодирующим тот же анти-CD19 CAR. CAR содержал анти-CD19 scFv, полученный из мышиного антитела, спейсер иммуноглобулина, трансмембранный домен, полученный из CD28, костимулирующий участок, полученный из 4-1BB, и внутриклеточный сигнальный домен CD3-дзета.

После трансдукции шарики удаляли из клеточных композиций путем воздействия магнитного поля. Затем $CD4^+$ и $CD8^+$ клетки отдельно культивировали для размножения с постоянным перемешиванием и переносом кислорода с помощью биореактора (Xuri W25 Bioreactor). В среду добавляли полоксамер. Обе клеточные композиции культивировали в присутствии IL-2 и IL-15. Среда для $CD4^+$ клеток также включала IL-7. $CD4^+$ и $CD8^+$ клетки, каждую культивировали до сбора до искомого количества клеток и/или концентрации. Через один день после достижения порогового значения клетки каждой композиции отдельно собирали, включали в состав и криогенно замораживали.

Для стадий криоконсервации, описанных в приведенных ниже примерах, использовали морозильник с контролируемой скоростью, использующий ступенчатый профиль замораживания.

Пример 2. Дизайн исследования

Для этого исследования использовали два здоровых донора (т.е. донора 1 и донора 2), и исходный материал для входящего афереза (APH) разделяли на пять различных групп для каждого донора. Одну пятую часть объема входящего афереза (контрольные группы или группы 5 и 10) промывали и подвергали стадии выделения для выделения $CD4^+$ и $CD8^+$ Т-клеток, после чего выбранные клетки криоконсервировали в течение 2 недель. Оставшийся аферез от каждого донора разделяли на 4 образца перед криоконсервированием (группы 1-4 и группы 6-9). Каждый криоконсервированный образец оттаивали, промывали и либо оставляли на два часа при 37°C с последующим отбором, либо подвергали стадии отбора сразу после оттаивания и промывания. Половина групп была заморожена после отбора, а другая половина была обработана непосредственно для активации.

Образцы в группах 1, 2, 6 и 7 подвергали криоконсервации в течение 2 недель перед оттаиванием клеток для выделения популяций $CD4^+$ и $CD8^+$ Т-клеток и подвергали клеточной активации. Группы 1 и 6 включали дополнительную стадию, стадию покоя, при которой после оттаивания клеткам оставляли в покое в течение 2 часов в инкубаторе до какой-либо дальнейшей обработки. Образцы в группах 3, 4, 8 и 9 подвергались криоконсервации в течение 2-4 дней до оттаивания для отбора популяций $CD4^+$ и $CD8^+$ Т-клеток, после чего выбранные популяции подвергались криоконсервации в течение 1

недели до оттаивания клеток и впоследствии подвергали стимуляции. Группы 3 и 8 включали дополнительную стадию, стадию покоя, в которой после оттаивания клетки оставляли в покое в течение 2 часов в инкубаторе до какой-либо дальнейшей обработки.

Клетки отбирали с помощью различных стадий обработки, включая стадию отбора, на которой выделяли CD4⁺ и CD8⁺ Т-клетки. На этом стадии отбора каждая группа была разделена на под-ветки (то есть подгруппы CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток), после чего выбранные клетки проходили через оставшиеся стадии обработки. В таблице 1 показан план исследования, в том числе стадии криоконсервации, которым подвергались каждая из групп.

Таблица 1. Дизайн исследования

Группа	Криоконсервация афереза (предварительное выделение)	Стадия покоя	Криоконсервация после выделения	Донор
<u>1</u>	<u>да</u>	<u>да</u>	<u>нет</u>	<u>1</u>
<u>2</u>	<u>да</u>	<u>нет</u>	<u>нет</u>	<u>1</u>
<u>3</u>	<u>да</u>	<u>да</u>	<u>да</u>	<u>1</u>
<u>4</u>	<u>да</u>	<u>нет</u>	<u>да</u>	<u>1</u>
<u>5</u>	<u>нет</u>	<u>нет</u>	<u>да</u>	<u>1</u>
<u>6</u>	<u>да</u>	<u>да</u>	<u>нет</u>	<u>2</u>
<u>7</u>	<u>да</u>	<u>нет</u>	<u>нет</u>	<u>2</u>
<u>8</u>	<u>да</u>	<u>да</u>	<u>да</u>	<u>2</u>
<u>9</u>	<u>да</u>	<u>нет</u>	<u>да</u>	<u>2</u>
<u>10</u>	<u>нет</u>	<u>нет</u>	<u>да</u>	<u>2</u>

Пример 3. Криоконсервация материала афереза не оказывает существенного влияния на фенотип клеток

Анализ потока был выполнен до и после криоконсервации образцов афереза, чтобы оценить влияние замораживания на распределение клеток различных фенотипов. Для оценки распределения фенотипов Т-клеток, В-клеток, NK-клеток, NK Т-клеток, моноцитов, дендритных клеток и Т-клеток памяти была разработана специальная панель. Результаты показывают, что распределение клеток разных фенотипов было одинаковым между образцами до и после криоконсервации.

Как криоконсервированные образцы афереза, так и образцы свежего афереза были проанализированы на наличие молекул CD4 и CD8 на поверхности клетки с помощью проточной цитометрии. Результаты этого анализа показали, что криоконсервация не влияет на уровень поверхностных молекул CD4 и CD8. Эти результаты также позволяют предположить, что криоконсервация афереза не повлияла на относительную долю CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток в образцах, так как процентное содержание этих клеток было сопоставимо до и после криогенного замораживания для обоих доноров.

Пример 4. Влияние криоконсервации на выделение популяций CD4⁺ и/или CD8⁺ Т-клеток

Чтобы дополнительно оценить, влияет ли криоконсервированный аферез на процессинг CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток, проводили анализ жизнеспособности на различных стадиях, ведущих к отбору интересующих клеток. Жизнеспособность клеток оценивали для клеток, подвергнутых криоконсервации перед стадией отбора, без периода покоя после криоконсервации (группы 2, 4, 7 и 9), клеток, подвергнутых криоконсервации перед стадией отбора, с периодом покоя после криоконсервации (группы 1, 3, 6 и 8) и клетки, подвергнутые криоконсервации после стадии выделения (группы 5 и 10 или контрольные группы) на различных стадиях способа. В частности, жизнеспособность оценивали после того, как аферез был собран; после того, как аферез был включен в состав для криоконсервации; после того, как аферез был подвергнут криоконсервации в течение определенного периода времени с последующим оттаиванием и разведением; после того, как оттаявший разведенный аферез был промыт; после того, как промытый аферез оставляли в покое на 2 часа в инкубаторе; после того, как покрытые антителом шарики добавляли к образцу; и после того, как CD8⁺ и/или CD4⁺ Т-клетки были выделены. Значения жизнеспособности клеток по всем группам были сопоставимы со значениями жизнеспособности клеток для контрольных групп на каждой стадии обработки.

Общее количество ядродержащих клеток (TNC) также определяли для всех образцов во время различных стадий, приводящих к выделению CD4⁺ и/или CD8⁺ Т-клеток. Было обнаружено, что потери клеток происходят в основном на стадии приготовления состава. Отношение выхода клеток, полученное путем нормализации значений числа клеток после выделения к значениям числа клеток до выделения, продемонстрировало, что потери клеток в криоконсервированных образцах афереза произошли до выделения популяций CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток и что выход клеток в процессе выделения не был затронут. Однако в этом эксперименте было обнаружено, что конечные значения TNC, соответствующие выбранным клеткам, немного различаются между некоторыми криоконсервированными группами афереза и контрольными группами каждого типа клеток для каждого донора, возможно, из-за потерь клеток, происходящих до выделения. Однако было обнаружено, что выход CD4⁺ Т-клеток для одного донора сопоставим между криоконсервированным аферезом и контрольной группой.

Пример 5. Оценка фенотипа и жизнеспособности клеток после стадий выделения и замораживания

После стадий выделения клетки, для которых требовалась стадия криоконсервации (группы 3, 4, 5, 8, 9 и 10), подвергали криоконсервации и затем оттаивали для

дальнейшего анализа. Клетки в группах 3, 4, 8 и 9 хранили криогенным способом в течение 1,5-2 недель перед размораживанием для дальнейшего анализа и обработки. Клетки в группах 5 и 10 (или контрольных группах) хранили в криогенных условиях в течение 2 недель перед тем, как разморозить для дальнейшего анализа и обработки. В этот момент были проведены анализы для всех выделенных популяций Т-клеток, полученных из всех групп каждого донора, перед любыми стадиями активации клеток. В анализе ТМЕМ оценивали присутствие различных маркеров Т-клеток в выбранных клеточных популяциях из разных групп каждого донора. Распределение фенотипов клеток (на основе обнаружения выбранных маркеров) не сильно различалось между криоконсервированными группами афереза и контрольными группами каждого типа клеток для каждого донора. Клетки в группах, которые не подвергались стадии замораживания после выделения, имели тенденцию к наивоподобным клеткам ($CD45RA^+/CCR7^+$, $CD27^+/CD28^+$) с меньшим количеством терминальных эффекторных клеток ($CD45RA^+$, $CCR7^-$). $CD62L$ был немного снижен в образцах, подвергнутых стадии замораживания после выделения.

Жизнеспособность клеток оценивали для всех групп клеток каждого типа от каждого донора до активации клеток. Жизнеспособность клеток не сильно варьировала между группами криоконсервированного афереза и контрольными группами каждого типа клеток от каждого донора. Кроме того, чтобы оценить эффекты стадии замораживания после выделения, были получены соотношения выхода клеток путем нормализации числа клеток, полученных после стадии замораживания после выделения, к числу клеток, полученных сразу после выделения, перед замораживанием. Отношения выхода клеток были одинаковыми между группами криоконсервированного афереза и контрольными группами.

Было обнаружено, что уровни каспазы 3 низкие (менее или около 5%) по всем группам.

Пример 6. Оценка жизнеспособности клеток и выхода клеток во время активации, трансдукции и экспансии

Как обсуждалось ранее, после стадии выделения группы исследования, которые должны были пройти стадию замораживания после выделения, хранились в криогенных условиях в течение определенного периода времени перед их оттаиванием и проводились через стадии активации, трансдукции и экспансии. Жизнеспособность клеток и значения ТНС определяли после размораживания криоконсервированного материала; затем оттаявший материал стимулировали в присутствии парамагнитным шариков, покрытых полистиролом, с прикрепленными анти-CD3 и анти-CD28 антителами; после этого

активированные клетки подверглись трансдукции; после этого шарики удаляли из клеток; и затем клетки размножали в течение 2 или 3 дней. Было обнаружено, что жизнеспособность клеток сопоставима между группами криоконсервированного афереза и контрольными группами каждого типа клеток для каждого донора. На стадии стимуляции значения жизнеспособности клеток для криоконсервированных групп афереза показали разницу менее чем на 20% по сравнению со значениями для их соответствующих контрольных групп. Эта процентная разница была ниже, чем 10% на всех других стадиях. Кроме того, значения TNC, полученные на каждой из этих стадий, были эквивалентны между группами криоконсервированных аферезов и их соответствующими контрольными группами. Кроме того, было обнаружено, что кратное размножение, рассчитанное на каждой стадии, эквивалентно между группами криоконсервированного афереза и их соответствующими контрольными группами.

Эти результаты показывают, что в этом эксперименте образцы криоконсервированного афереза без стадии покоя или дополнительной криоконсервации сразу после выделения и образцы криоконсервированного афереза со стадией покоя, но без дополнительной стадии криоконсервации сразу после выделения, имеют сходные или более высокие конечные выходы клеток по сравнению с их соответствующими контрольными группами.

Пример 7. Оценка жизнеспособности клеток, выхода клеток и активности клеток во время приготовления криоконсервированной композиции

Клетки из каждой группы, полученные после стадии размножения, были приготовлены в криоконсервирующей среде и заморожены. Затем образцы оттаивали для дальнейшего анализа. Значения жизнеспособности и выхода клеток определяли для клеток во всех группах исследования на этой стадии. На этой стадии средняя жизнеспособность и количество клеток были эквивалентны между криоконсервированными группами афереза и их соответствующими контрольными группами.

Анализы также выполняли для оценки распределения фенотипа клеток для всех групп. Было обнаружено, что клеточные фенотипы статистически эквивалентны между криоконсервированными группами афереза и их соответствующими контрольными группами. Группы, которые не подвергались стадии замораживания после выделения, имели тенденцию к содержанию большого процента клеток $CD45RA^+/CCR7^+$ и $CD27^+/CD28^+$ и меньшего процента клеток $CD45RA^+$, $CCR7^-$. Кроме того, в этом эксперименте было обнаружено, что уровни каспазы 3 были немного выше для групп $CD8^+$ Т-клеток по сравнению с группами $CD4^+$ Т-клеток, причем группы, которые

включали стадию замораживания после выделения, демонстрировали более высокий уровень каспазы, чем группы, которые не включали эту стадию.

Секрецию гамма-интерферона ($IFN\gamma$) использовали для оценки функциональности Т-клеток после обработки. Т-клетки из каждой группы стимулировали, для продуцирования $IFN\gamma$. После стимуляции надосадочные жидкости собирали и измеряли секретируемый $IFN\gamma$ в надосадочной жидкости. Значения для всех экспериментальных условий соответствовали значениям для их соответствующих контролей, что демонстрирует, что клеточная активность конечного клеточного продукта не была затронута стадией ранней криоконсервации.

Цитолитический анализ также проводили для оценки цитолитической активности продуцируемых $CD8^+$ Т-клеток. Цитолитическую активность измеряли при различных соотношениях клеток-эффекторов к клеткам-мишеням для определения EC_{50} (соотношение, необходимое для уничтожения 50% клеток-мишеней). Было обнаружено, что поскольку различие кратности цитолитического EC_{50} между криоконсервированными группами афереза по сравнению с их соответствующими контрольными группами было ниже, чем двукратное различие, то это позволяет предположить, что состояния различных групп не имели существенных изменений в цитолитическом EC_{50} полученных клеток.

Примерные воплощения

1. Способ, включающий: криогенное хранение клеток из биологического образца, полученного от донора, где клетки были получены от донора в момент времени, а именно (i) после того, как донору был поставлен диагноз заболевания или состояния, и перед тем, как донор получил одно или несколько из следующего: любое начальное лечение заболевания или состояния, любое целевое лечение или любое лечение, помеченное для лечения заболевания или состояния, или любое лечение, отличное от облучения и/или химиотерапии, (ii) после первого рецидива у донора заболевания или состояния после первоначального лечения заболевания или состояния и до того, как донор получил лечение после рецидива заболевания или состояния, или (iii) момент времени, когда донору не был поставлен диагноз или не было известно или не подозревалось наличие заболевания или состояния.

2. Способ по воплощению 1, в котором биологический образец является или получен из образца крови донора.

3. Способ по воплощению 1 или воплощению 2, в котором клетки не были подвергнуты стадии отбора и/или не были обогащены по популяции клеток крови и/или популяции Т-клеток и/или подмножества Т-клеток, до криогенного хранения.

4. Способ по воплощению 1 или воплощению 2, в котором клетки подвергали

стадии отбора и/или обогащению по популяции клеток крови и/или Т-клеток перед криогенным хранением, необязательно, где способ дополнительно включает отбор или обогащение популяции клеток из биологического образца до указанного криогенного хранения.

5. Способ по воплощению 4, в котором стадия отбора и/или обогащения включает иммуноаффинный отбор и/или включает положительный или отрицательный отбор.

6. Способ по любому из воплощений 2-5, в котором: стадия отбора и/или обогащения включает обогащение и/или выделение $CD4^+$ клеток или их подмножества и/или $CD8^+$ клеток или их подмножества, где обогащение или выделение $CD4^+$ клеток или их подмножества проводят либо отдельно, либо в комбинации с отбором и/или выделением $CD8^+$ клеток или их подмножества, при этом необязательно, когда подмножество $CD8^+$ клеток и/или подмножество $CD4^+$ клеток необязательно выбраны из группы, состоящей из клеток памяти, Т-клеток центральной памяти (T_{CM}), клеток эффекторной памяти (T_{EM}), стволовых клеток центральной памяти (T_{SCM}), эффекторных Т-клеток (T_E), Т-клеток эффекторной памяти RA (T_{EMRA}), наивных Т-клеток (T_N) и/или регуляторных Т-клеток (T_{REG}).

7. Способ по любому из воплощений 1-6, где клетки содержат или обогащены Т-клетками.

8. Способ по воплощению 7, в котором Т-клетки содержат или обогащены $CD4^+$ Т-клетками или их подмножеством, $CD8^+$ Т-клетками или их подмножеством, или их смесью, где подмножество $CD8^+$ клеток и/или подмножество $CD4^+$ клеток необязательно выбраны из группы, состоящей из клеток памяти, Т-клеток центральной памяти (T_{CM}), клеток эффекторной памяти (T_{EM}), стволовых клеток центральной памяти (T_{SCM}), эффекторных Т-клеток (T_E), Т-клеток эффекторной памяти RA (T_{EMRA}) памяти, наивных Т-клеток (T_N) и/или регуляторных Т-клеток (T_{REG}).

9. Способ по любому из воплощений 1-8, дополнительно включающий, до криогенного хранения клеток: охлаждение клеток до температуры, меньшей или равной 0°C .

10. Способ по воплощению 8, дополнительно включающий, перед хранением и/или перед охлаждением клеток: объединение клеток с замораживающим раствором.

11. Способ по воплощению 10, в котором среда для замораживания содержит около 10% диметилсульфоксида (DMSO) и сывороточный белок, необязательно человеческий сывороточный альбумин, необязательно около 4% человеческого сывороточного альбумина и/или где среда для замораживания содержит и/или конечная концентрация композиции, в которой клетки криоконсервированы и хранятся, составляет от около 1%

до около 20%, от около 3% до около 9% или от около 6% до около 9% по объему DMSO и/или составляет около 3% около 4%, около 5%, около 5,5%, около 6%, около 6,5%, около 7%, около 7,5%, около 8%, около 8,5%, около 9%, около 9,5% или около 10% по объему DMSO.

12. Способ по любому из воплощений 9-11, в котором охлаждение клеток включает понижение температуры со скоростью, равной или около 1°C в минуту, необязательно, пока температура не достигнет около или -80°C.

13. Способ по любому из воплощений 1-11, в котором клетки криогенно хранят в контейнере, помещенном в паровую фазу жидкого азота, где контейнером является, необязательно, мешок или флакон, подходящий для криоконсервации.

14. Способ по любому из воплощений 1-13, где клетки хранят криогенным способом в течение периода времени, превышающего или равного 12 часам, 24 часам, 36 часам, 48 часам, 1 неделе, 2 неделям, 3 неделям или 4 неделям, 1 месяцу, 2 месяцам, 3 месяцам, 4 месяцам, 5 месяцам, 6 месяцам, 7 месяцам, 8 месяцам, 9 месяцам, 10 месяцам, 11 месяцам, 1 году, 2 годам, 3 годам, 4 годам, 5 годам, 6 годам, 7 годам, 8 годам, 9 годам, 10 годам, 11 годам, 12 годам, 13 годам, 14 годам, 15 годам, 16 годам, 17 годам, 18 годам, 19 годам, 20 годам, 25 годам, 30 годам, 35 годам или 40 годам.

15. Способ по любому из воплощений 1-14, в котором клетки хранят в течение некоторого периода времени, и после истечения этого периода процентное содержание жизнеспособных клеток или жизнеспособных Т-клеток, их подтипа или подмножества в композиции составляет от около 24% до около 100% или составляет, по меньшей мере, около 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85 или 90%.

16. Способ по любому из воплощений 1-15, у котором заболевание представляет собой онкологическое заболевание, воспалительное заболевание или состояние, аутоиммунное заболевание или состояние или инфекционное заболевание или состояние.

17. Способ по воплощению 16, где онкологическое заболевание представляет собой хронический лимфоцитарный лейкоз, острый лимфоцитарный лейкоз, пролимфоцитарный лейкоз, волосатоклеточный лейкоз, острый лимфоцитарный лейкоз, острый лимфобластный лейкоз с нулевым фенотипом, лимфому Ходжкина, неходжкинскую лимфому, диффузную В-крупноклеточную лимфому, множественную миелому, фолликулярную лимфому, лимфому маргинальной зоны селезенки, лимфому мантийных клеток, индолентную В-клеточную лимфому или острый миелоидный лейкоз.

18. Способ по воплощению 16 или 17, в котором онкологическое заболевание включает клетки, экспрессирующие, по меньшей мере, один из числа ROR1, EGFR, Her2, L1-CAM, CD19, CD20, CD22, мезотелин, CEA и поверхностного антигена гепатита В,

антифолатного рецептора, CD23, CD24, CD30, CD33, CD38, CD44, EGFR, EGP-2, EGP-4, EPHa2, ErbB2, 3 или 4, FBP, фетального ацетилхолинового рецептора, GD2, GD3, HMW-MAA, IL-22R-альфа, IL-13R-альфа2, kdr, легкой цепи каппа, Lewis Y, молекулы адгезии клеток L1, MAGE-A1, мезотелина, MUC1, MUC16, антигена созреваания В-клеток (BCMA), FCRL5/FCRH5, GPRC5D, PSCA, лигандов NKG2D, NY-ESO-1, MART-1, gp100, онкофетального антигена, ROR1, TAG72, VEGF-R2, карциноэмбрионального антигена (CEA), простат-специфического антигена, PSMA, Her2/neu, рецептора эстрогена, рецептора прогестерона, эфрина B2, CD123, CS-1, c-Met, GD-2 и MAGE A3, CE7, белка опухоли Вильмса 1 (WT-1), циклина, такого как циклин A1 (CCNA1).

19. Способ по любому из воплощений 1-18, в котором первоначальное лечение или последующее лечение представляет собой химиотерапию, облучение и/или хирургическое вмешательство и/или представляет собой лечение для удаления побочных эффектов.

20. Способ по воплощению 19, в котором начальное лечение или последующее лечение представляет собой или включает комбинированную химиотерапию.

21. Способ по любому из воплощений 1-20, в котором донором является человек.

22. Способ по любому из воплощений 1-21, дополнительно включающий анализ клеток перед криогенным хранением, необязательно путем оценки поверхностной экспрессии клеток для одного или нескольких фенотипических маркеров.

23. Способ по любому из воплощений 1-21, дополнительно включающий оттаивание криогенно хранящихся клеток.

24. Способ по воплощению 23, дополнительно включающий выполнение посткриогенной модификации для увеличения активности клеток.

25. Способ по воплощению 24, в котором посткриогенная модификация основана на анализе клеток перед криогенным хранением.

26. Способ по любому из воплощений 23-25, дополнительно включающий, после криогенного хранения и/или оттаивания клеток, конструирование клеток для экспрессии рекомбинантной или экзогенной молекулы, которая необязательно является рекомбинантным белком, необязательно рекомбинантным рецептором, который необязательно является или содержит Т-клеточный рецептор (TCR), химерный рецептор и/или химерный антигенный рецептор.

27. Способ по воплощению 26, в котором рекомбинантная молекула представляет собой рекомбинантный рецептор, который специфически распознает или связывается с антигеном, экспрессируемым, специфически экспрессируемым или ассоциированным с заболеванием или состоянием.

28. Способ по любому из воплощений 1-26, в котором количество клеток,

собранных у донора, и/или общее количество в образце афереза, составляет или около или составляет не более или около 500×10^6 , 1000×10^6 , 2000×10^6 , 3000×10^6 , 4000×10^6 или 5000×10^6 или более суммарных клеток или суммарных ядросодержащих клеток.

29. Способ обработки образца афереза, включающий: (а) доставку в охлажденной среде образца афереза, полученного от донора, в хранилище; и (б) криогенное хранение образца афереза, возможно, в хранилище.

30. Способ по воплощению 29, дополнительно включающий обогащение Т-клеток из образца афереза перед отправкой и/или до криогенного хранения образца.

31. Способ по воплощению 30, в котором Т-клетки представляют собой или содержат или обогащены по $CD4^+$ Т-клеткам или их подмножеству, $CD8^+$ Т-клеткам или их подмножеству или их смеси, необязательно, где подмножество $CD8^+$ клеток и/или подмножество $CD4^+$ клеток необязательно выбирают из группы, состоящей из клеток памяти, Т-клеток центральной памяти (T_{CM}), клеток эффекторной памяти (T_{EM}), стволовых клеток центральной памяти (T_{SCM}), эффекторных Т-клеток (T_E), Т-клеток эффекторной памяти RA (T_{EMRA}), наивных Т-клеток (T_N) и/или регуляторных Т-клеток (T_{REG}) и/или где образец обогащен по тотальным Т-клеткам.

32. Способ по любому из воплощений 29-31, дополнительно включающий анализ образца афереза перед отправкой.

33. Способ по любому из воплощений 29-32, дополнительно включающий добавление замораживающего раствора к образцу афереза перед отправкой.

34. Способ по воплощению 32, дополнительно включающий добавление замораживающего раствора к образцу афереза перед отправкой, причем среду для замораживания выбирают на основе анализа образца афереза перед отправкой.

35. Способ по любому из воплощений 29-34, дополнительно включающий криогенное замораживание образца афереза перед отправкой.

36. Способ по воплощению 35, дополнительно включающий обогащение Т-клеток из образца афереза после доставки и до криогенного хранения клеток.

37. Способ по воплощению 36, в котором Т-клетки представляют собой или содержат или обогащены по $CD4^+$ Т-клеткам или их подмножеству, $CD8^+$ Т-клеткам или их подмножеству или их смеси, необязательно, где подмножество $CD8^+$ клеток и/или подмножество $CD4^+$ клеток необязательно выбрано из группы, состоящей из клеток памяти, Т-клеток центральной памяти (T_{CM}), клеток эффекторной памяти (T_{EM}), стволовых клеток центральной памяти (T_{SCM}), эффекторных Т-клеток (T_E), Т-клеток эффекторной памяти RA (T_{EMRA}), наивных Т-клеток (T_N) и/или регуляторных Т-клеток (T_{REG}) и/или содержат тотальные Т-клетки.

38. Способ по любому из воплощений 36-37, дополнительно включающий анализ образца афереза или Т-клеток после доставки и до криогенного хранения клеток.

39. Способ по любому из воплощений 36-38, дополнительно включающий добавление замораживающего раствора к образцу афереза или Т-клеткам после доставки и перед криогенным хранением клеток.

40. Способ по воплощению 38, дополнительно включающий добавление замораживающего раствора к образцу афереза или Т-клеткам после доставки и до криогенного хранения клеток, при этом среду для замораживания необязательно выбирают на основе анализа образца афереза или Т-клеток после доставки и до криогенного хранения клеток.

41. Способ по любому из воплощений 29-40, дополнительно включающий оттаивание криогенно хранящихся клеток.

42. Способ по воплощению 41, дополнительно включающий анализ клеток после оттаивания.

43. Способ по воплощению 42, дополнительно включающий отбор условий для дальнейшей модификации клеток на основе анализа после оттаивания.

44. Способ лечения, включающий: получение и, возможно, оттаивание криогенно замороженного образца клеток, необязательно содержащего Т-клетки, полученного от объекта, где до указанного получения клетки были криогенно заморожены в течение периода, по меньшей мере, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 месяцев или, по меньшей мере, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 лет; модифицирование клеток для экспрессии рекомбинантного антигенного рецептора; и введение клеток объекту.

45. Способ по воплощению 44, в котором образец был заморожен и/или сохранен в соответствии со способом любого из воплощений 1-43.

Дополнительные примерные воплощения I

1. Способ получения композиции сконструированных клеток, включающий: (a) инкубацию в стимулирующих условиях исходной композиции, содержащей Т-клетки, обогащенные первичными CD4⁺ Т-клетками человека, причем указанные стимулирующие условия включают присутствие (i) стимулирующего реагента способны активировать один или несколько внутриклеточных сигнальных доменов одного или нескольких компонентов комплекса TCR и/или один или несколько внутриклеточных сигнальных доменов одной или нескольких костимулирующих молекул и (ii) одного или нескольких цитокинов, тем самым получая стимулированную композицию; и (b) введение рекомбинантного рецептора в стимулированную композицию, тем самым получая сконструированную композицию, содержащую сконструированные Т-клетки, где

исходная композиция является или получена из образца, который хранился в криогенном состоянии в течение периода, по меньшей мере, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 месяцев или, по меньшей мере, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 лет.

2. Способ по воплощению 1, в котором стимулирующий реагент содержит первичный агент, который специфически связывается с элементом комплекса TCR, который, необязательно, специфически связывается с CD3.

3. Способ по воплощению 2, в котором стимулирующий реагент дополнительно содержит вторичный агент, который специфически связывается с костимулирующей молекулой Т-клеток, необязательно, где костимулирующая молекула выбрана из CD28, CD137 (4-1-BB), OX40 или ICOS.

4. Способ по воплощению 2 или воплощению 3, в котором первичные и/или вторичные агенты включают антитело, необязательно, где стимулирующий реагент включает инкубацию с антителом против CD3 и антителом против CD28 или его антигенсвязывающим фрагментом.

5. Способ по любому из воплощений 2-4, в котором первичный агент и/или вторичный агент присутствует на поверхности твердой подложки.

6. Способ по воплощению 5, в котором твердый носитель представляет собой или содержит шарик.

7. Способ по воплощению 6, в котором шарик имеет диаметр, превышающий или превышающий около 3,5 мкм, но не более около 9 мкм или не более около 8 мкм или не более около 7 мкм или не более около 6 мкм или не более 5 мкм.

8. Способ по воплощению 6 или воплощению 7, в котором шарик имеет диаметр равный или около 4,5 мкм.

9. Способ по любому из воплощений 6-8, в котором шарик является инертным.

10. Способ по любому из воплощений 6-9, в котором шарик представляет собой или содержит полистирольную поверхность.

11. Способ по любому из воплощений 6-10, в котором шарик является магнитным или суперпарамагнитным.

12. Способ по любому из воплощений 6-11, в котором отношение шариков к клеткам составляет менее 3:1.

13. Способ по любому из воплощений 6-12, в котором отношение шариков к клеткам составляет от или от около 2: 1 до 0,5:1.

14. Способ по любому из воплощений 6-13, где отношение шариков к клеткам составляет или составляет около 1:1.

15. Способ по любому из воплощений 1-14, в котором введение включает

трансдукцию клеток стимулированной композиции вирусным вектором, содержащим полинуклеотид, кодирующий рекомбинантный рецептор.

16. Способ по воплощению 15, в котором вирусный вектор представляет собой ретровирусный вектор.

17. Способ по воплощению 15 или воплощению 16, в котором вирусный вектор представляет собой лентивирусный вектор или гамма-ретровирусный вектор.

18. Способ по любому из воплощений 15-17, в котором введение осуществляют в присутствии адъюванта для трансдукции.

19. Способ по любому из воплощений 1-18, в котором введение включает трансфекцию клеток стимулированной композиции вектором, содержащим полинуклеотид, кодирующий рекомбинантный рецептор.

20. Способ по п. 19, в котором вектор представляет собой транспозон, необязательно транспозон Sleeping Beauty (SB) или транспозон Piggybac.

21. Способ по любому из воплощений 1-20, дополнительно включающий культивирование сконструированной композиции в условиях, способствующих пролиферации или размножению сконструированных клеток, с получением, таким образом, выходной композиции, содержащей сконструированные Т-клетки.

22. Способ по воплощению 21, в котором стимулирующий реагент удаляют из сконструированной композиции перед культивированием.

23. Способ по воплощению 22, в котором удаление шариков включает воздействие на клетки сконструированной композиции магнитным полем.

24. Способ по любому из воплощений 21-23, в котором, по меньшей мере, часть культивирования выполняют при постоянном перемешивании и/или перфузии.

25. Способ получения сконструированной клеточной композиции, включающий: (а) инкубацию в стимулирующих условиях исходной композиции, содержащей первичные Т-клетки, обогащенные одними из или обеими первичными $CD4^+$ и $CD8^+$ Т-клетками человека, причем указанные стимулирующие условия включают присутствие (i) стимулирующего реагента, способного активировать один или несколько внутриклеточных сигнальных доменов одного или нескольких компонентов комплекса TCR и/или один или несколько внутриклеточных сигнальных доменов одной или нескольких костимулирующих молекул и (ii) одного или нескольких цитокинов, тем самым приводя к получению стимулированной композиции; и (b) введение рекомбинантного рецептора в стимулированную композицию, тем самым приводя к получению стимулированной композиции, содержащей сконструированные Т-клетки, где исходная композиция является или получена из образца, который хранился в криогенном

состоянии в течение периода, по меньшей мере, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 месяцев или, по меньшей мере, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 лет.

26. Способ по воплощению 24 или воплощению 35, в котором стимулирующий реагент содержит первичный агент, который специфически связывается с элементом комплекса TCR, необязательно, который специфически связывается с CD3.

27. Способ по воплощению 26, в котором стимулирующий реагент дополнительно содержит вторичный агент, который специфически связывается с костимулирующей молекулой Т-клеток, необязательно, где костимулирующая молекула выбрана из CD28, CD137 (4-1-BB), OX40 или ICOS.

28. Способ по воплощению 26 или воплощению 27, в котором первичные и/или вторичные агенты включают антитело, необязательно, где стимулирующий реагент включает инкубацию с антителом против CD3 и антителом против CD28 или его антигенсвязывающим фрагментом.

29. Способ по любому из воплощений 26-28, в котором первичный агент и/или вторичный агент присутствуют на поверхности твердой подложки.

30. Способ по воплощению 29, в котором твердый носитель представляет собой или содержит шарик.

31. Способ по воплощению 30, в котором шарик имеет диаметр, превышающий или превышающий около 3,5 мкм, но не более чем около 9 мкм или не более чем около 8 мкм или не более чем около 7 мкм или не более чем около 6 мкм, или не более чем около 5 мкм.

32. Способ по воплощению 30 или по воплощению 31, в котором шарик имеет диаметр равный или около 4,5 мкм.

33. Способ по любому из воплощений 30-32, в котором шарик является инертным.

34. Способ по любому из воплощений 30-33, в котором шарик представляет собой или содержит полистирольную поверхность.

35. Способ по любому из воплощений 30-34, в котором шарик является магнитным или суперпарамагнитным.

36. Способ по любому из воплощений 30-35, в котором отношение шариков к клеткам составляет менее 3:1.

37. Способ по любому из воплощений 30-36, в котором отношение шариков к клеткам составляет от или от около 2: 1 до 0,5: 1.

38. Способ по любому из воплощений 30-37, в котором отношение шариков к клеткам составляет или составляет около 1:1.

39. Способ по любому из воплощений 24-38, в котором введение включает

трансдукцию клеток стимулированной композиции вирусным вектором, содержащим полинуклеотид, кодирующий рекомбинантный рецептор.

40. Способ по воплощению 39, в котором вирусный вектор представляет собой ретровирусный вектор.

41. Способ по воплощению 39 или воплощению 40, в котором вирусный вектор представляет собой лентивирусный вектор или гамма-ретровирусный вектор.

42. Способ по любому из воплощений 24-41, в котором введение осуществляют в присутствии адъюванта для трансдукции.

43. Способ по любому из воплощений 24-38, в котором введение включает трансфекцию клеток стимулированной композиции вектором, содержащим полинуклеотид, кодирующий рекомбинантный рецептор.

44. Способ по воплощению 43, в котором вектор представляет собой транспозон, необязательно транспозон Sleeping Beauty (SB) или транспозон Piggybac.

45. Способ по воплощению 24 или воплощению 25, в котором сконструированная клеточная композиция не содержит стимулирующий реагент, и/или стимулирующий реагент по существу удален из композиции перед культивированием, причем указанный стимулирующий реагент содержит реагент, способный активировать один или несколько внутриклеточных сигнальных домена одного или нескольких компонентов комплекса TCR и/или одного или нескольких внутриклеточных сигнальных доменов одной или нескольких костимулирующих молекул.

46. Способ по любому из воплощений 21-45, в котором культивирование выполняют, по меньшей мере, до тех пор, пока выходная композиция не будет содержать пороговое количество Т-клеток.

47. Способ по воплощению 46, в котором культивирование продолжают в течение, по меньшей мере, одного дня после достижения порогового количества Т-клеток.

48. Способ по любому из воплощений 21-47, в котором после культивирования собирают клетки выходной композиции.

49. Способ по любому из воплощений 21-48, дополнительно включающий объединение в состав клеток выходной композиции для криоконсервации и/или введения объекту, необязательно в присутствии фармацевтически приемлемого наполнителя.

50. Способ по воплощению 49, в котором клетки выходной композиции объединяют в состав в присутствии криопротектора.

51. Способ по воплощению 50, в котором криопротектор включает DMSO.

52. Способ по любому из воплощений 49-51, в котором клетки выходной композиции объединяют в состав в контейнере, необязательно во флаконе или пакете.

53. Способ по любому из воплощений 1-38, дополнительно включающий выделение $CD4^+$ и/или $CD8^+$ Т-клеток из биологического образца перед инкубацией.

54. Способ по воплощению 53, в котором выделение включает отбор клеток на основе поверхностной экспрессии $CD4$ и/или $CD8$, необязательно путем положительного или отрицательного отбора.

55. Способ по воплощению 53 или воплощению 54, в котором выделение включает проведение отбора на основе иммуноаффинности.

56. Способ по любому из воплощений 53-55, в котором биологический образец содержит первичные Т-клетки, полученные от объекта.

57. Способ по воплощению 56, в котором объектом является человек.

58. Способ по любому из воплощений 53-55, в котором биологический образец представляет собой или содержит образец цельной крови, образец лейкоцитомоноцитарного слоя, образец мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC), образец нефракционированных Т-клеток, образец лимфоцитов, образец лейкоцитов, продукт афереза или продукт лейкоафереза.

59. Способ по любому из воплощений 53-55, в котором биологический образец представляет собой или содержит криоконсервированный продукт афереза или криоконсервированный продукт лейкоафереза.

60. Способ по любому из воплощений 1-59, в котором рекомбинантный рецептор способен связываться с антигеном-мишенью, который ассоциирован, специфичен и/или экспрессируется на клетке или ткани заболевания, расстройства или состояния.

61. Способ по воплощению 60, в котором заболевание, расстройство или состояние представляет собой инфекционное заболевание или расстройство, аутоиммунное заболевание, воспалительное заболевание или опухоль или злокачественную опухоль.

62. Способ по воплощению 60 или воплощению 61, в котором целевой антиген представляет собой опухолевый антиген.

63. Способ по любому из воплощений 60-62, в котором целевой антиген выбран из 5T4, 8H9, интегрин $\alpha v\beta 6$, B7-H6, антигена созревания В-клеток (BCMA), CA9, раково-тестикулярного антигена, карбоангидразы 9 (CAIX), CCL-1, CD19, CD20, CD22, CEA, поверхностного антигена гепатита В, CD23, CD24, CD30, CD33, CD38, CD44, CD44v6, CD44v7/8, CD123, CD138, CD171, карциноэмбрионального антигена (CEA), CE7, циклина, циклина A2, c-Met, двойного антигена, EGFR, эпителиального гликопротеина 2 (EPG-2), эпителиального гликопротеина 40 (EPG-40), EPHA2, эфрина B2, erb-B2, erb-B3, erb-B4, димеров erbB, EGFR vIII, рецептора эстрогена, фетального AchR, альфа-рецептора фолата, фолат-связывающего белка (FBP), FCRL5, FCRH5, фетального ацетилхолинового

рецептора, G250/CAIX, GD2, GD3, gp100, сопряжённого с G-белком рецептора 5D (GPCR), Her2/neu (рецепторной тирозинкиназы erbB2), HMW-MAA, IL-22R-альфа, IL-13-рецептора альфа-2 (IL-13Ra2), рецептора, содержащего домен вставки киназы (kdr), легкой цепи каппа, Lewis Y, L1- молекулы клеточной адгезии (L1-CAM), связанного с меланомой антигена (MAGE)-A1, MAGE-A3, MAGE-A6, MART-1, мезотелина, мышинового CMV, муцина 1 (MUC1), MUC16, NCAM, NKG2D, лигандов NKG2D, NY-ESO-1, О-ацетилированного GD2 (OGD2), онкофетального антигена, преимущественно экспрессируемого антигена меланомы (PRAME), PSCA, рецептора прогестерона, сурвивина, ROR1, TAG72, tEGFR, рецепторов VEGF, VEGF-R2, белка опухоли Вильмса 1 (WT-1), патоген-специфического антигена и антигена, связанного с универсальной меткой.

64. Способ по любому из воплощений 1-63, в котором рекомбинантный рецептор представляет собой или содержит функциональный не-TCR антигенный рецептор или TCR или его антигенсвязывающий фрагмент.

65. Способ по любому из воплощений 1-64, в котором рекомбинантный рецептор представляет собой химерный антигенный рецептор (CAR).

66. Способ по любому из воплощений 1-65, в котором рекомбинантный рецептор представляет собой анти-CD19 CAR.

67. Способ по воплощению 65, в котором химерный антигенный рецептор содержит внеклеточный домен, содержащий антигенсвязывающий домен.

68. Способ по воплощению 67, в котором антигенсвязывающий домен представляет собой или содержит антитело или его антительный фрагмент, который необязательно является одноцепочечным фрагментом.

69. Способ по воплощению 68, в котором фрагмент содержит переменные области антитела, соединенные гибким линкером.

70. Способ по воплощению 68 или воплощению 69, в котором фрагмент содержит scFv.

71. Способ по любому из воплощений 67-70, в котором химерный антигенный рецептор дополнительно содержит спейсер и/или шарнирную область.

72. Способ по любому из воплощений 67-71, в котором химерный антигенный рецептор содержит внутриклеточную сигнальную область.

73. Способ по воплощению 72, в котором внутриклеточная сигнальная область содержит внутриклеточный сигнальный домен.

74. Способ по воплощению 73, в котором внутриклеточный сигнальный домен представляет собой или содержит первичный сигнальный домен, сигнальный домен,

который способен индуцировать первичный сигнал активации в Т-клетке, сигнальный домен компонента рецептора Т-клетки (TCR) и/или сигнальный домен, содержащий иммунорецепторный тирозиновый активирующий мотив (ITAM).

75. Способ по воплощению 74, в котором внутриклеточный сигнальный домен представляет собой или содержит внутриклеточный сигнальный домен цепи CD3, необязательно цепи CD3-дзета (CD3 ζ) или ее сигнальной части.

76. Способ по любому из воплощений 72-75, в котором химерный антигенный рецептор дополнительно содержит трансмембранный домен, расположенный между внеклеточным доменом и внутриклеточной сигнальной областью.

77. Способ по любому из воплощений 72-76, в котором внутриклеточная сигнальная область дополнительно содержит костимулирующую сигнальную область.

78. Способ по воплощению 77, в котором костимуляторная сигнальная область содержит внутриклеточный сигнальный домен костимулирующей молекулы Т-клеток или ее сигнальную часть.

79. Способ по воплощению 77 или 78, в котором костимулирующая сигнальная область содержит внутриклеточный сигнальный домен CD28, 4-1BB или ICOS или их сигнальную часть.

80. Способ по любому из воплощений 77-79, в котором костимуляторная сигнальная область находится между трансмембранным доменом и внутриклеточной сигнальной областью.

81. Способ по любому из воплощений 46-47, в котором выходная композиция, содержащая пороговое число или большее количество клеток, производится в количестве, превышающем или превышающем около 85%, превышающем или превышающем около 90% или превышающем или превышающем около 95% итераций способа.

82. Композиция, содержащая сконструированные клетки, полученные способом по любому из воплощений 1-79.

83. Композиция по воплощению 82, дополнительно включающая фармацевтически приемлемый носитель.

84. Композиция по воплощению 82 или воплощению 83, содержащая криопротектор, необязательно DMSO.

85. Изделие, содержащее композицию в соответствии с любым из вариантов воплощения 80-82 и инструкции по введению выходной композиции объекту.

86. Изделие по воплощению 85, в котором у объекта имеется заболевание или состояние, необязательно, когда рекомбинантный рецептор специфически распознает или специфически связывается с антигеном, ассоциированным или экспрессируемым или

присутствующим на клетках заболевания или состояния.

87. Изделие по воплощению 85 или по воплощению 86, в котором выходная композиция представляет собой композицию сконструированных CD4⁺ Т-клеток.

88. Изделие по воплощению 85 или по воплощению 86, в котором выходная композиция представляет собой композицию сконструированных CD8⁺ Т-клеток.

89. Изделие, содержащее композицию сконструированных CD4⁺ Т-клеток, полученных способом по любому из воплощений 1-25 или 26-81, композицию сконструированных CD8⁺ Т-клеток, полученных способом по любому из пп. 2-23, 25 или 26-81, и инструкции по введению сконструированных CD4⁺ Т-клеток и сконструированных CD8⁺ Т-клеток объекту.

90. Изделие по воплощению 89, в котором в инструкциях отдельно указывается введение CD4⁺ Т-клеток и CD8⁺ Т-клеток объекту.

91. Изготовленное изделие согласно воплощению 89 или воплощению 90, в котором инструкции определяют введение CD4⁺ Т-клеток и CD8⁺ Т-клеток объекту в искомом соотношении.

Дополнительные примерные воплощения II

1. Способ хранения биологического образца, включающий получение биологического образца от объекта, разделяющий биологический образец на два или более отдельных контейнера с криоконсервацией биологического образца, хранящего криоконсервированный биологический образец.

2. Способ по воплощению 1, в котором объект является человеком.

3. Способ по любому из воплощений 1-2, в котором биологический образец представляет собой продукт афереза или продукт лейкофереза.

4. Способ по любому из воплощений 1-3, в котором каждый из двух или более отдельных контейнеров выбирают из группы, состоящей из криогенного пакета и/или криогенного флакона.

5. Способ по любому из воплощений 1-4, в котором два или более отдельных контейнера содержат уникальный идентификатор.

6. Способ по воплощению 5, в котором уникальный идентификатор содержит любую одну или несколько из числа текстовой информации, RFID-метки, QR-кода и/или штрих-кода.

7. Способ по любому из воплощений 5-6, в котором информация об уникальном идентификаторе содержит информацию о любой одной или нескольких из следующих категорий: личность объекта, место хранения образца, инструкции по хранению и/или обращению, дата получения дата криоконсервации, срок годности и предполагаемое

применение.

8. Способ по любому из воплощений 1-7, в котором биологический образец хранится в течение периода времени, превышающего или равного 12 часам, 24 часам, 36 часам, 48 часам, 1 неделе, 2 неделям, 3 неделям или 4 неделям, 1 месяцу, 2 месяцам, 3 месяцам, 4 месяцам, 5 месяцам, 6 месяцам, 7 месяцам, 8 месяцам, 9 месяцам, 10 месяцам, 11 месяцам, 1 году, 2 годам, 3 годам, 4 годам, 5 годам, 6 годам, 7 годам, 8 годам, 9 годам, 10 годам, 11 годам, 12 годам, 13 годам, 14 годам, 15 годам, 16 годам, 17 годам, 18 годам, 19 годам, 20 годам, 25 годам, 30 годам, 35 годам или 40 годам.

9. Способ хранения биологического образца, включающий: (а) получение биологического образца от объекта; (b) криоконсервацию биологического образца в одном или нескольких контейнерах; и (с) хранение криоконсервированного биологического образца в течение периода времени, превышающего или равного 12 часам, 24 часам, 36 часам, 48 часам, 1 неделе, 2 неделям, 3 неделям или 4 неделям, 1 месяцу, 2 месяцам, 3 месяцам, 4 месяцам, 5 месяцам, 6 месяцам, 7 месяцам, 8 месяцам, 9 месяцам, 10 месяцам, 11 месяцам, 1 году, 2 годам, 3 годам, 4 годам, 5 годам, 6 годам, 7 годам, 8 годам, 9 годам, 10 годам, 11 годам, 12 годам, 13 годам, 14 годам, 15 годам, 16 годам, 17 годам, 18 годам, 19 годам, 20 годам, 25 годам, 30 годам, 35 годам или 40 годам.

10. Способ по воплощению 9, в котором объект является человеком.

11. Способ по любому из воплощений 9-10, в котором биологический образец представляет собой продукт афереза или продукт лейкофереза.

12. Способ по любому из воплощений 9-11, в котором один или несколько контейнеров выбирают из группы, состоящей из криогенного пакета и/или криогенного флакона.

13. Способ по любому из воплощений 9-12, в котором один или несколько отдельных контейнеров содержат уникальный идентификатор.

14. Способ по воплощению 13, в котором уникальный идентификатор содержит любое одно или несколько из числа текстовой информации, RFID-метки, QR-кода и/или штрих-кода.

15. Способ по любому из воплощений 13-14, в котором информация об уникальном идентификаторе содержит информацию о любой одной или нескольких из следующих категорий: личность объекта, местоположение инструкций по хранению, хранению и/или обработке образца, дата получения дата криоконсервации, срок годности и предполагаемое применение.

16. Способ получения биологического образца, соответствующего объекту, включающий: (а) размещение криоконсервированного образца в центральном учреждении

на основании уникального идентификатора, ассоциирующего образец с объектом; и (b) получение криоконсервированного образца.

17. Способ по воплощению 16, в котором биологический образец генетически сопоставленный с объектом, подходит для получения аутологичного продукта для объекта и/или содержит клетки объекта.

Дополнительные примерные воплощения III

1. Способ, включающий криогенное хранение клеток из биологического образца, полученного от донора, при котором клетки получают от донора в момент времени, а именно после того, как донору поставлен диагноз, или предполагается, что он имеет или подозревается на наличие заболевания или состояния, и до того, как донор получил один или несколько способов лечения заболевания или состояния; и при этом клетки замораживают в морозильной камере с контролируемой скоростью, используя ступенчатый профиль замораживания, включающий, по меньшей мере, одну стадию, при которой образец и/или камеру охлаждают со скоростью, превышающей 1 °C в минуту.

2. Способ, включающий криогенное хранение клеток из биологического образца, полученного от донора, в котором клетки были получены от донора в момент времени после того, как донор был признан невосприимчивым или испытал рецидив после схемы лечения заболевания или состояния, и до того, как донор получил последующее лечение заболевания или состояния.

3. Способ, включающий криогенное хранение клеток из биологического образца, полученного от донора, в котором клетки были получены от донора в тот момент времени, когда донору не был поставлен диагноз, или не было известно или не подозревалось наличие заболевания или состояния, и в котором клетки замораживают в морозильной камере с контролируемой скоростью с использованием ступенчатого профиля замораживания, содержащего, по меньшей мере, одну стадию, на которой образец и/или камеру охлаждают со скоростью, превышающей 1 °C в минуту.

4. Способ, включающий: (a) криогенное замораживание клеток из биологического образца, полученного от донора, и (b) хранение криогенно замороженных клеток в течение периода времени, при котором клетки получают или были получены от донора в момент времени, а именно (i) после того, как у донора диагностировано заболевание или состояние, или считается, что он имеет или подозревается на наличие заболевания, и до того, как донор получил лечение заболевания или состояния; или (ii) после того, как донор был признан невосприимчивым или испытал рецидив после схемы лечения заболевания или состояния, и до того, как донор получил последующее лечение заболевания или состояния, и где в течение периода хранения донор получает или получал, по меньшей

мере, одно лечение заболевания или состояния.

5. Способ, включающий: (a) криогенное замораживание клеток из биологического образца, полученного от донора, и (b) хранение криогенно замороженных клеток в течение периода времени, где клетки получают или были получены от донора в момент времени, а именно (i) после того, как у донора диагностировано заболевание или состояние, или считается, что он имеет или подозревается на наличие заболевания, и до того, как донор получил лечение заболевания или состояния; или (ii) после того, как донор был признан невосприимчивым или испытал рецидив после схемы лечения заболевания или состояния, и до того, как донор получил последующее лечение заболевания или состояния, и где клетки хранятся криогенно в течение периода времени, превышающего или равного 12 часам, 24 часам, 36 часам, 48 часам, 1 неделе, 2 неделям, 3 неделям или 4 неделям, 1 месяцу, 2 месяцам, 3 месяцам, 4 месяцам, 5 месяцам, 6 месяцам, 7 месяцам, 8 месяцам, 9 месяцам, 10 месяцам, 11 месяцам, 1 году, 2 годам, 3 годам, 4 годам, 5 годам, 6 годам, 7 годам, 8 годам, 9 годам, 10 годам, 11 годам, 12 годам, 13 годам, 14 годам, 15 годам, 16 годам, 17 годам, 18 годам, 19 годам, 20 годам, 25 годам, 30 годам, 35 годам или 40 годам, или до тех пор, пока донору не понадобятся клетки.

6. Способ, включающий: (a) криогенное замораживание клеток из биологического образца, полученного от донора, и (b) введение терапевтически эффективного количества композиции, содержащей сконструированные Т-клетки, полученные из криогенно замороженных клеток, объекту, нуждающемуся в этом, где клетки получают или были получены от донора в момент времени, а именно (i) после того, как у донора диагностировано заболевание или состояние, или считается, что он имеет или подозревается на наличие заболевания, и до того, как донор получил лечение заболевания или состояния; или (ii) после того, как донор был признан невосприимчивым или испытал рецидив после схемы лечения заболевания или состояния, и до того, как донор получил последующее лечение заболевания или состояния, и где между замораживанием и введением донор получает или получал, по меньшей мере, одно лечение заболевания или состояния.

7. Способ, включающий: (a) криогенное замораживание клеток из биологического образца, полученного от донора, с образованием, таким образом, криогенно замороженной клеточной композиции и (b) конструирование клеток из криогенно замороженной клеточной композиции для создания композиции, содержащей сконструированные Т-клетки, где клетки получают или были получены от донора в момент времени, а именно (i) после того, как у донора диагностировано заболевание или состояние, или считается, что он имеет или подозревается на наличие заболевания, и до

того, как донор получил лечение заболевания или состояния; или (ii) после того, как донор был признан невосприимчивым или испытал рецидив после схемы лечения заболевания или состояния, и до того, как донор получил последующее лечение заболевания или состояния, и где между замораживанием и конструированием донор получает или получал, по меньшей мере, одно лечение заболевания или состояния.

8. Способ лечения, включающий введение терапевтически эффективного количества сконструированных Т-клеток объекту, нуждающемуся в этом, в котором при котором клетки получают или были получены от объекта в момент времени, а именно (i) после того, как у донора диагностировано заболевание или состояние или предполагается, что донор имеет или подозревается на наличие заболевания или состояния, и до того, как донор получил лечение от заболевания или состояния; или (ii) после того, как объект был признан невосприимчивым или испытал рецидив после схемы лечения заболевания или состояния, и до того, как объект получил последующее лечение заболевания или состояния, и где после криогенного хранения и перед получением криогенно хранящихся клеток, донор получает или получал по меньшей мере, одно лечение заболевания или состояния.

9. Способ получения композиции сконструированных клеток, включающий: (a) получение и необязательно оттаивание криогенно хранящихся клеток и (b) введение рекомбинантного рецептора в криогенно хранящиеся клетки, с получением тем самым сконструированной композиции, содержащей сконструированные Т-клетки, где клетки хранятся в криогенных условиях после сбора у донора в момент времени, а именно (i) после того, как у донора диагностировано заболевание или состояние или предполагается, что донор имеет или подозревается на наличие заболевания или состояния, и до того, как донор получил лечение от заболевания или состояния; или (ii) после того, как донор был признан невосприимчивым или испытал рецидив после схемы лечения заболевания или состояния, и до того, как донор получил последующее лечение заболевания или состояния, и в котором после криогенного хранения и до получения криогенно хранящиеся клетки, донор получает или получал, по меньшей мере, одно лечение заболевания или состояния.

10. Способ по любому из воплощений 1-9, в котором биологический образец является или получен из образца афереза, необязательно образца лейкоафереза, и/или где образец содержит лейкоциты и/или лимфоциты и/или где клетки или клетки крови в образце состоят в основном из лейкоцитов, или в которых, по меньшей мере, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% клеток в образце или, по меньшей мере, 80% 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% клеток крови в образце являются лейкоцитами.

11. Способ по любому из воплощений 1-10, в котором клетки не подвергали стадии иммуноаффинного и/или целевого отбора и/или обогащения для популяции клеток крови и/или популяции Т-клеток и/или подмножества Т-клеток, до того как они будут храниться в криогенных условиях.

12. Способ по любому из воплощений 1-10, в котором клетки подвергали иммуноаффинной и/или мишень-специфической стадии отбора и/или обогащения для популяции клеток крови и/или Т-клеток перед криогенным хранением, необязательно при этом способ дополнительно включает проведение указанного отбора или обогащения до указанного криогенного хранения.

13. Способ по воплощению 12, в котором стадия отбора и/или обогащения включает иммуноаффинный отбор и/или включает положительный или отрицательный отбор.

14. Способ по любому из воплощений 12-13, в котором: стадия отбора и/или обогащения включает обогащение и/или выделение $CD4^{+}$ клеток или их подмножества и/или $CD8^{+}$ клеток или их подмножества, где обогащение или выделение $CD4^{+}$ клеток или их подмножества осуществляют либо отдельно, либо в комбинации с отбором и/или выделением $CD8^{+}$ клеток или их подмножества, при этом необязательно, когда подмножество $CD8^{+}$ клеток и/или подмножество $CD4^{+}$ клеток необязательно выбрано из группы, состоящей из клеток памяти, Т-клеток центральной памяти (T_{CM}), клеток эффекторной памяти (T_{EM}), стволовых клеток центральной памяти (T_{SCM}), эффекторных Т-клеток (T_E), Т-клеток эффекторной памяти RA (T_{EMRA}), наивных Т-клеток (T_N) и/или регуляторных Т-клеток (T_{REG}).

15. Способ по любому из воплощений 1-14, в котором клетки содержат или обогащены Т-клетками.

16. Способ по воплощению 15, в котором Т-клетки содержат или обогащены $CD4^{+}$ Т-клетками или их подмножеством, $CD8^{+}$ Т-клетками или их подмножеством или их смесью, где подмножество $CD8^{+}$ клеток и/или подмножество $CD4^{+}$ клеток необязательно выбирается из группы, состоящей из клеток памяти, Т-клеток центральной памяти (T_{CM}), клеток эффекторной памяти (T_{EM}), стволовых клеток центральной памяти (T_{SCM}), эффекторных Т-клеток (T_E), Т-клеток эффекторной памяти RA (T_{EMRA}), наивных Т-клеток (T_N) и/или регуляторных Т-клеток (T_{REG}).

17. Способ по любому из воплощений 1-16, дополнительно включающий, перед криогенным хранением клеток, объединение клеток с криоконсервирующей средой.

18. Способ по воплощению 17, в котором криоконсервирующая среда содержит около 10% диметилсульфоксида (DMSO) и сывороточный белок, необязательно

человеческий сывороточный альбумин, необязательно около 4% человеческого сывороточного альбумина и/или где среда для замораживания содержит и/или конечная концентрация биологического образца составляет от около 1% до около 20%, от около 3% до около 9% или от около 6% до около 9% по объему DMSO и/или составляет около 3%, около 4%, около 5 %, около 5,5%, около 6%, около 6,5%, около 7%, около 7,5%, около 8%, около 8,5%, около 9%, около 9,5% или около 10% по объему DMSO.

19. Способ по любому из воплощений 2 или 4-18, в котором криогенное хранение включает понижение температуры со скоростью, равной или около 1°C в минуту, необязательно, пока температура не достигнет около или -80°C.

20. Способ по любому из воплощений 1-19, в котором клетки криогенно хранят в контейнере, помещенном в паровую фазу жидкого азота, где контейнер необязательно представляет собой пакет или флакон.

21. Способ по любому из воплощений 1-20, в котором клетки хранят в криогенных условиях в течение периода времени, превышающего или равного 12 часам, 24 часам, 36 часам, 48 часам, 1 неделе, 2 неделям, 3 неделям или 4 неделям, 1 месяцу, 2 месяцам, 3 месяцам, 4 месяцам, 5 месяцам, 6 месяцам, 7 месяцам, 8 месяцам, 9 месяцам, 10 месяцам, 11 месяцам, 1 году, 2 годам, 3 годам, 4 годам, 5 годам, 6 годам, 7 годам, 8 годам, 9 годам, 10 годам, 11 годам, 12 годам, 13 годам, 14 годам, 15 годам, 16 годам, 17 годам, 18 годам, 19 годам, 20 годам, 25 годам, 30 годам, 35 годам или 40 годам.

22. Способ по любому из воплощений 1-21, в котором клетки хранят в течение некоторого периода времени и где после определенного периода времени процент жизнеспособных клеток или жизнеспособных Т-клеток или их подтипа или подмножества в композиции составляет от около 24% до около 100% или составляет, по меньшей мере, около 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85 или 90%.

23. Способ по любому из воплощений 1-22, в котором заболевание представляет собой онкологическое заболевание, воспалительное заболевание или состояние, аутоиммунное заболевание или состояние или инфекционное заболевание или состояние.

24. Способ по воплощению 23, где онкологическое заболевание представляет собой хронический лимфоцитарный лейкоз, острый лимфоцитарный лейкоз, пролимфоцитарный лейкоз, волосатоклеточный лейкоз, острый лимфоцитарный лейкоз, острый лимфобластный лейкоз с нулевым фенотипом, лимфому Ходжкина, неходжкинскую лимфому, диффузную В-крупноклеточную лимфому, множественную миелому, фолликулярную лимфому, лимфому маргинальной зоны селезенки, лимфому мантийных клеток, индолентную В-клеточную лимфому или острый миелоидный лейкоз.

25. Способ по воплощению 23 или 24, в котором онкологическое заболевание

включает клетки, экспрессирующие, по меньшей мере, одно из числа ROR1, EGFR, Her2, L1-CAM, CD19, CD20, CD22, мезотелин, CEA и поверхностного антигена гепатит В, антифолатного рецептора, CD23, CD24, CD30, CD33, CD38, CD44, EGFR, EGP-2, EGP-4, ERNa2, ErbB2, 3 или 4, FBP, фетального ацетилхолинового рецептора, GD2, GD3, HMW-MAA, IL-22R-альфа, IL-13R-альфа2, kdr, легкой цепи каппа, Lewis Y, молекулы адгезии клеток L1, MAGE-A1, мезотелина, MUC1, MUC16, антигена созревания В-клеток (BCMA), FCRL5/FCRH5, GPRC5D, PSCA, лигандов NKG2D, NY-ESO-1, MART-1, gp100, онкофетального антигена, ROR1, TAG72, VEGF-R2, карциноэмбрионального антигена (CEA), простат-специфического антигена, PSMA, Her2/neu, рецептора эстрогена, рецептора прогестерона, эфрина B2, CD123, CS-1, c-Met, GD-2 и MAGE A3, CE7, белка опухоли Вильмса 1 (WT-1), циклина, такого как циклин A1 (CCNA1).

26. Способ по любому из воплощений 1-25, в котором лечение представляет собой химиотерапию, лучевую терапию, хирургическое вмешательство, клеточную терапию и/или циторедуктивное лечение.

27. Способ по воплощению 26, в котором лечение включает одно или несколько из следующих обработок отдельно или в комбинации: циклофосфамид, метотрексат, 5-фторурацил, доксорубин, мустин, винкристин, прокарбазин, преднизолон, блеомицин, винбластин, дакарбазин, этопозид, цисплатин, эпирубин, капецитабин, фолиновую кислоту, оксалиплатин, низкомолекулярный ингибитор, иммунную клетку, природные клетки-киллеры, лимфокин-активированные клетки-киллеры, цитотоксические Т-клетки, дендритные клетки, радиация 4000 сГр, спасение аутологичных стволовых клеток, трансплантация стволовых клеток, трансплантация костного мозга, трансплантации гемопоэтических стволовых клеток (HSCT), CAR Т-клеточную терапию, тисагенлеклейсел, аксикабтаген силорейсел, цитарабин, высокие дозы цитарабина, даунорубин (дауномицин), идарубин, кладрибин, бортезомиб, карфилзомиб, талидомид, леналидомид, помалидомид, кортикостероиды, преднизон, дексаметазон, алкилирующий агент, хлорамбуцил, бендамустин, ифосфамид, лекарственное средство на основе платины, цисплатин, карбоплатин, оксалиплатин, пуриновый аналог, флударабин, пентостатин, кладрибин, антимаболизит, гемцитабин, метотрексат, прелатрексат, винкристин, доксорубин, митоксантрон, блеомицин, ингибитор протеасомы, ингибитор гистондеацетилазы, ромидеписин, белиностаб, киназный ингибитор, ибрутиниб, иделалисиб, антитело, ритумаб, антитело, антибактуум, антитело, антибитум, антитело, ритумаб, антитело, антибитум, антитело, анти-CD20-антитело, ритуксимаб, обинутумаб, офатумаб, ибритумаб тиуксетан, анти-CD52-антитело, алемтумаб, анти-CD30-антитело, брентуксимаб, ведотин, интерферон, иммуномодулирующий агент,

талидомид, CHOP, CHOP+R (или R-CHOP), CVP, EPOCH, EPOCH + R, DHAP, DHAP + R (или R-DHAP), венетоклакс, метилпреднизолон или ингибитор тирозинкиназы Брутона (BTKi).

28. Способ по любому из воплощений 1-27, в котором донором или объектом является человек.

29. Способ по любому из воплощений 1-28, дополнительно включающий анализ клеток перед криогенным хранением, необязательно путем оценки поверхностной экспрессии клеток на наличие одного или нескольких фенотипических маркеров.

30. Способ по любому из воплощений 1-29, дополнительно включающий оттаивание криогенно хранящихся клеток.

31. Способ по любому из воплощений 1-30, дополнительно включающий, после криогенного хранения и/или оттаивания клеток, конструирование клеток для экспрессии рекомбинантной или экзогенной молекулы, которая необязательно является рекомбинантным белком, необязательно рекомбинантным рецептором, который необязательно является или содержит Т-клеточный рецептор (TCR), химерный рецептор и/или химерный антигенный рецептор.

32. Способ по воплощению 31, в котором рекомбинантная молекула представляет собой рекомбинантный рецептор, который специфически распознает или связывается с антигеном, экспрессируемым или специфически экспрессируемым клетками, ассоциированными с заболеванием или состоянием.

33. Способ по любому из воплощений 1-32, в котором количество клеток, когда их забирают у донора или объекта и/или общее количество в образце афереза, составляет или составляет около, или составляет не более чем или около 500×10^6 , 1000×10^6 , 2000×10^6 , 3000×10^6 , 4000×10^6 , или 5000×10^6 или более тотальных клеток или тотальных ядродержащих клеток.

34. Способ по любому из воплощений 1-33, дополнительно включающий обогащение Т-клеток из образца до криогенного хранения образца.

35. Способ по воплощению 34, в котором Т-клетки представляют собой или содержат или обогащены по $CD4^+$ Т-клеткам или их подмножеству, $CD8^+$ Т-клеткам или их подмножеству или их смеси, необязательно, где подмножество $CD8^+$ клеток и/или подмножество $CD4^+$ клеток необязательно выбирают из группы, состоящей из клеток памяти, Т-клеток центральной памяти (T_{CM}), клеток эффекторной памяти (T_{EM}), стволовых клеток центральной памяти (T_{SCM}), эффекторных Т-клеток (T_E), Т-клеток эффекторной памяти RA (T_{EMRA}), наивных Т-клеток (T_N) и/или регуляторных Т-клеток (T_{REG}) и/или где образец обогащен по тотальным Т-клеткам.

36. Способ по любому из воплощений 1-35, дополнительно включающий составление образца в криогенной среде перед криогенным хранением образца.

37. Способ по любому из воплощений 1-36, дополнительно включающий доставку клеток в хранилище либо до, либо после криогенного замораживания.

38. Способ по воплощению 37, в котором хранилище является центральным или общим репозиторным хранилищем.

39. Способ по воплощению 37 или 38, в котором образец отправляют в охлажденной среде в хранилище.

40. Способ по любому из воплощений 36-39, дополнительно включающий обогащение Т-клеток из образца после доставки и до криогенного хранения клеток.

41. Способ по воплощению 40, в котором Т-клетки представляют собой или содержат или обогащены по $CD4^+$ Т-клеткам или их подмножеству, $CD8^+$ Т-клеткам или их подмножеству или их смеси, необязательно, где подмножество $CD8^+$ клеток и/или подмножество $CD4^+$ клеток необязательно выбрано из группы, состоящей из клеток памяти, Т-клеток центральной памяти (T_{CM}), клеток эффекторной памяти (T_{EM}), стволовых клеток центральной памяти (T_{SCM}), эффекторных Т-клеток (T_E), Т-клеток эффекторной памяти RA (T_{EMRA}), наивных Т-клеток (T_N) и/или регуляторных Т-клеток (T_{REG}) и/или содержат тотальные Т-клетки.

42. Способ по воплощению 40 или воплощению 41, дополнительно включающий объединение образца и/или Т-клеток в криогенной среде после доставки и до криогенного хранения клеток.

43. Способ по любому из воплощений 1-42, дополнительно включающий оттаивание криогенно хранящихся клеток.

44. Способ по любому из воплощений 1-43, в котором образец помещают в контейнер, помеченный одним или несколькими кодами или идентификаторами, для каталогизации клеток во время обработки, криоконсервации и/или хранения.

45. Способ по воплощению 44, в котором один или несколько кодов или идентификаторов содержат текстовые идентификаторы, штрих-коды, QR-коды, RFID или транспондеры.

46. Способ по воплощению 44 или воплощению 45, в котором один или несколько кодов или идентификаторов соответствуют или указывают идентичность одного или нескольких из числа: донора, образца, флакона, контейнера, заболевания и/или хранилища.

47. Способ по любому из воплощений 44-46, в котором один или несколько кодов или идентификаторов соответствуют коду, появляющемуся на браслете, удостоверяющем

личность пациента, или в больничной, медицинской системе или документации или в системе или документации учреждения для сбора.

48. Способ обработки, включающий: получение и, возможно, оттаивание криогенно хранящихся клеток способами любого из воплощений 1-47, в котором до указанного получения клетки криогенно хранили в течение периода, по меньшей мере, 12 часам, 24 часам, 36 часам, 48 часам, 1 неделе, 2 неделям, 3 неделям или 4 неделям, 1 месяцу, 2 месяцам, 3 месяцам, 4 месяцам, 5 месяцам, 6 месяцам, 7 месяцам, 8 месяцам, 9 месяцам, 10 месяцам, 11 месяцам, 1 году, 2 годам, 3 годам, 4 годам, 5 годам, 6 годам, 7 годам, 8 годам, 9 годам, 10 годам, 11 годам, 12 годам, 13 годам, 14 годам, 15 годам, 16 годам, 17 годам, 18 годам, 19 годам, 20 годам, 25 годам, 30 годам, 35 годам или 40 годам; введение рекомбинантного рецептора в стимулированную композицию, в результате чего создается сконструированная композиция, содержащая сконструированные Т-клетки, и введение клеток объекту.

49. Способ по любому из воплощений 1-48, в котором обработка не включает сконструированные Т-клетки или клетки криогенно замороженной композиции.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ, включающий криогенное хранение клеток из биологического образца, полученного от донора,

где клетки получают от донора в момент времени, а именно после того, как у донора диагностировано заболевание или состояние, или считается, что донор имеет или предположительно имеет заболевание или состояние, и до того, как донор получил один или несколько способов лечения заболевания или состояние; и

причем клетки замораживают в морозильнике с контролируемой скоростью, используя ступенчатый профиль замораживания, включающий, по меньшей мере, одну стадию, при которой образец и/или камеру охлаждают со скоростью, превышающей 1°C в минуту.

2. Способ, включающий криогенное хранение клеток из биологического образца, полученного от донора, где клетки были получены от донора в момент времени после того, как донор был признан невосприимчивым или испытал рецидив после схемы лечения заболевания или состояния, и до того, как донор получил последующее лечение заболевания или состояния.

3. Способ, включающий криогенное хранение клеток из биологического образца, полученного от донора, где клетки были получены от донора в момент времени, когда донору не был поставлен диагноз, или не было известно или не подозревалось наличие заболевания или состояния, и

где клетки замораживают в морозильнике с контролируемой скоростью, используя ступенчатый профиль замораживания, включающий, по меньшей мере, одну стадию, при которой образец и/или камеру охлаждают со скоростью, превышающей 1°C в минуту.

4. Способ, включающий:

- криогенное замораживание клеток из биологического образца, полученного от донора, и

- хранение криогенно замороженных клеток в течение определенного периода времени,

где клетки получают или были получены от донора в момент времени, а именно (i) после того, как у донора диагностировано заболевание или состояние, или считается, что он имеет или подозревается на наличие заболевания, и до того, как донор получил лечение заболевания или состояния; или (ii) после того, как донор был признан невосприимчивым к, или испытал рецидив после схемы лечения заболевания или состояния, и до того, как донор получил последующее лечение заболевания или состояния, и

где в течение периода хранения донор получает или получал, по меньшей мере, одно лечение заболевания или состояния.

5. Способ, включающий:

- криогенное замораживание клеток из биологического образца, полученного от донора, и

- хранение криогенно замороженных клеток в течение определенного периода времени,

где клетки получают или были получены от донора в момент времени, а именно (i) после того, как у донора диагностировано заболевание или состояние, или считается, что он имеет или подозревается на наличие заболевания, и до того, как донор получил лечение заболевания или состояния; или (ii) после того, как донор был признан невосприимчивым к, или испытал рецидив после схемы лечения заболевания или состояния, и до того, как донор получил последующее лечение заболевания или состояния, и

где клетки хранятся криогенно в течение периода времени, превышающего или равного 12 часам, 24 часам, 36 часам, 48 часам, 1 неделе, 2 неделям, 3 неделям или 4 неделям, 1 месяцу, 2 месяцам, 3 месяцам, 4 месяцам, 5 месяцам, 6 месяцам, 7 месяцам, 8 месяцам, 9 месяцам, 10 месяцам, 11 месяцам, 1 году, 2 годам, 3 годам, 4 годам, 5 годам, 6 годам, 7 годам, 8 годам, 9 годам, 10 годам, 11 годам, 12 годам, 13 годам, 14 годам, 15 годам, 16 годам, 17 годам, 18 годам, 19 годам, 20 годам, 25 годам, 30 годам, 35 годам или 40 годам, или до тех пор, пока донору не понадобятся клетки.

6. Способ, включающий:

- криогенное замораживание клеток из биологического образца, полученного от донора, и

- введение терапевтически эффективного количества композиции, содержащей сконструированные Т-клетки, полученные из криогенно замороженных клеток, объекту, нуждающемуся в этом,

где клетки получают или были получены от донора в момент времени, а именно (i) после того, как у донора диагностировано заболевание или состояние, или считается, что он имеет или подозревается на наличие заболевания, и до того, как донор получил лечение заболевания или состояния; или (ii) после того, как донор был признан невосприимчивым к, или испытал рецидив после схемы лечения заболевания или состояния, и до того, как донор получил последующее лечение заболевания или состояния, и

где между замораживанием и введением донор получает или получал, по меньшей мере, одно лечение заболевания или состояния.

7. Способ, включающий:

- криогенное замораживание клеток из биологического образца, полученного от донора, в результате чего образуется криогенно замороженная клеточная композиция, и

- конструирование клеток из криогенно замороженной клеточной композиции для создания композиции, содержащей сконструированные Т-клетки,

где клетки получают или были получены от донора в момент времени, а именно (i) после того, как у донора диагностировано заболевание или состояние, или считается, что он имеет или подозревается на наличие заболевания, и до того, как донор получил лечение заболевания или состояния; или (ii) после того, как донор был признан невосприимчивым к, или испытал рецидив после схемы лечения заболевания или состояния, и до того, как донор получил последующее лечение заболевания или состояния, и

при этом между замораживанием и разработкой донор получает или получал, по меньшей мере, одно лечение заболевания или состояния.

8. Способ лечения, включающий введение терапевтически эффективного количества сконструированных Т-клеток объекту, нуждающемуся в этом,

где клетки получают или были получены от объекта в момент времени, а именно (i) после того, как у объекта диагностировано заболевание или состояние, или считается, что он имеет или предположительно имеется, и до того, как объект получил лечение заболевания или состояния; или (ii) после того, как объект был признан невосприимчивым к, или испытал рецидив после схемы лечения заболевания или состояния, и до того, как объект получил последующее лечение заболевания или состояния, и

где после того, как клетки получают или были получены от объекта, и перед введением сконструированных Т-клеток объект получает или получал, по меньшей мере, одно лечение заболевания или состояния.

9. Способ получения композиции сконструированных клеток, включающий:

- получение и необязательно оттаивание криогенно хранящихся клеток, и
- введение рекомбинантного рецептора в криогенно хранящиеся клетки, что тем самым приводит к получению сконструированной композиции, содержащей сконструированные Т-клетки,

где клетки хранятся в криогенных условиях после сбора у донора в момент времени, а именно (i) после того, как у донора диагностировано заболевание или состояние, или предполагается, что он имеет или подозревается, и до того, как донор получил лечение заболевания или состояния; или (ii) после того, как донор был признан невосприимчивым к, или испытал рецидив после схемы лечения заболевания или состояния, и до того, как донор получил последующее лечение заболевания или состояния, и

где после криогенного хранения и до получения криогенно хранящихся клеток донор получает или получал, по меньшей мере, одно лечение заболевания или состояния.

10. Способ по любому из пп. 1-9, в котором биологический образец представляет собой или получен из образца афереза, необязательно образца лейкофереза, и/или где образец содержит лейкоциты и/или лимфоциты и/или где клетки или клетки крови в образце состоят в основном из лейкоцитов, или в которых, по меньшей мере, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% клеток в образце или, по меньшей мере, 80% 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% клеток крови в образце являются лейкоцитами.

11. Способ по любому из пп. 1-10, в котором клетки не подвергали стадии иммуноаффинного и/или мишень-специфического отбора и/или обогащения популяции клеток крови и/или популяции Т-клеток и/или подмножества Т-клеток, до того как они будут храниться в криогенных условиях.

12. Способ по любому из пп. 1-10, в котором клетки подвергали стадии иммуноаффинного и/или мишень-специфического отбора и/или обогащения популяции клеток крови и/или популяции Т-клеток перед хранением в криогенных условиях, необязательно где способ дополнительно включает проведение указанного отбора или обогащения до указанного криогенного хранения.

13. Способ по п. 12, в котором стадия отбора и/или обогащения включает иммуноаффинный отбор и/или включает положительный или отрицательный отбор.

14. Способ по любому из пп. 12-13, в котором:

стадия отбора и/или обогащения включает обогащение и/или выделение $CD4^+$ клеток или их подмножества и/или $CD8^+$ клеток или их подмножества, при этом обогащение или выделение $CD4^+$ клеток или их подмножества проводится либо отдельно, либо в комбинации с отбором и/или выделением $CD8^+$ клеток или их подмножества,

необязательно, где подмножество $CD8^+$ клеток и/или подмножество $CD4^+$ клеток необязательно выбирается из группы, состоящей из клеток памяти, Т-клеток центральной памяти (T_{CM}), клеток эффекторной памяти (T_{EM}), стволовых клеток центральной памяти (T_{SCM}), эффекторных Т-клеток (T_E), Т-клеток эффекторной памяти RA (T_{EMRA}), наивных Т-клеток (T_N) и/или регуляторных Т-клеток (T_{REG}).

15. Способ по любому из пп. 1-14, в котором клетки содержат или обогащены Т-клетками.

16. Способ по п. 15, в котором Т-клетки содержат или обогащены $CD4^+$ Т-клетками или их подмножеством, $CD8^+$ Т-клетками или их подмножеством, или их смесью, где подмножество $CD8^+$ клеток и/или подмножество клетки $CD4^+$ необязательно выбирается из группы, состоящей из клеток памяти, Т-клеток центральной памяти (T_{CM}), клеток

эффекторной памяти (T_{EM}), стволовых клеток центральной памяти (T_{SCM}), эффекторных Т-клеток (T_E), Т-клеток эффекторной памяти RA (T_{EMRA}), наивных Т-клеток (T_N) и/или регуляторных Т-клеток (T_{REG}).

17. Способ по любому из пп. 1-16, дополнительно включающий, перед криогенным хранением клеток, объединение клеток со средой для криоконсервации.

18. Способ по п. 17, в котором криоконсервационная среда содержит около 10% диметилсульфоксида (DMSO) и сывороточный белок, необязательно человеческий сывороточный альбумин, необязательно около 4% человеческого сывороточного альбумина и/или где среда для замораживания содержит и/или конечная концентрация биологического образца составляет от около 1% до около 20%, от около 3% до около 9% или от около 6% до около 9% по объему DMSO и/или составляет около 3%, около 4%, около 5%, около 5,5%, около 6%, около 6,5%, около 7%, около 7,5%, около 8%, около 8,5%, около 9%, около 9,5% или около 10% по объему DMSO.

19. Способ по любому из пп. 2 или 4-18, в котором криогенное хранилище включает понижение температуры со скоростью, равной или около 1°C в минуту, необязательно, пока температура не достигнет около или -80°C .

20. Способ по любому из пп. 1-19, в котором клетки хранят в криогенных условиях в контейнере, помещенном в паровую фазу жидкого азота, где этот контейнер необязательно представляет собой мешок или флакон.

21. Способ по любому из пп. 1-20, в котором клетки криогенно хранят в течение периода времени, превышающего или равного 12 часам, 24 часам, 36 часам, 48 часам, 1 неделе, 2 неделям, 3 неделям или 4 неделям, 1 месяцу, 2 месяцам, 3 месяцам, 4 месяцам, 5 месяцам, 6 месяцам, 7 месяцам, 8 месяцам, 9 месяцам, 10 месяцам, 11 месяцам, 1 году, 2 годам, 3 годам, 4 годам, 5 годам, 6 годам, 7 годам, 8 годам, 9 годам, 10 годам, 11 годам, 12 годам, 13 годам, 14 годам, 15 годам, 16 годам, 17 годам, 18 годам, 19 годам, 20 годам, 25 годам, 30 годам, 35 годам или 40 годам.

22. Способ по любому из пп. 1 - 21, в котором клетки хранятся в течение некоторого периода времени и где после определенного периода времени процент жизнеспособных клеток или жизнеспособных Т-клеток или их подтипа или подмножества в композиции составляет от около 24% до около 100% или составляет, по меньшей мере, около 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85 или 90%.

23. Способ по любому из пп. 1-22, в котором заболевание представляет собой онкологическое заболевание, воспалительное заболевание или состояние, аутоиммунное заболевание или состояние или инфекционное заболевание или состояние.

24. Способ по п. 23, в котором онкологическое заболевание представляет собой

хронический лимфоцитарный лейкоз, острый лимфоцитарный лейкоз, пролимфоцитарный лейкоз, волосатоклеточный лейкоз, острый лимфоцитарный лейкоз, острый лимфобластный лейкоз с нулевым фенотипом, лимфому Ходжкина, неходжкинскую лимфому, диффузную В-крупноклеточную лимфому, множественную миелому, фолликулярную лимфому, лимфому маргинальной зоны селезенки, лимфому мантийных клеток, индолентную В-клеточную лимфому или острый миелоидный лейкоз.

25. Способ по п. 23 или 24, в котором онкологическое заболевание включает клетки, экспрессирующие, по меньшей мере, один из числа ROR1, EGFR, Her2, L1-CAM, CD19, CD20, CD22, мезотелина, CEA и поверхностного антигена гепатита В, антифоллатного рецептора, CD23, CD24, CD30, CD33, CD38, CD44, EGFR, EGP-2, EGP-4, ERHa2, ErbB2, 3 или 4, FBP, фетального ацетилхолинового рецептора, GD2, GD3, HMW-MAA, IL-22R-альфа, IL-13R-альфа2, kdr, легкой цепи каппа, Lewis Y, молекулы адгезии клеток L1, MAGE-A1, MUC1, MUC16, антигена созревания В-клеток (BCMA), FCRL5/FCRH5, GPRC5D, PSCA, лигандов NKG2D, NY-ESO-1, MART-1, gp100, онкофетального антигена, TAG72, VEGF-R2, карциноэмбрионального антигена (CEA), простат-специфического антигена, PSMA, Her2/neu, рецептора эстрогена, рецептора прогестерона, эфрина B2, CD123, CS-1, c-Met, GD-2 и MAGE A3, CE7, белка опухоли Вильмса 1 (WT-1), циклина, такого как циклин A1 (CCNA1).

26. Способ по любому из пп. 1-25, в котором лечение представляет собой химиотерапию, лучевую терапию, хирургическое вмешательство, клеточную терапию и/или циторедуктивное лечение.

27. Способ по п. 26, в котором лечение включает одну или несколько из следующих обработок отдельно или в комбинации: циклофосфамид, метотрексат, 5-фторурацил, доксорубицин, мустин, винкристин, прокарбазин, преднизолон, блеомицин, винбластин, дакарбазин, этопозид, цисплатин, эпирубицин, капецитабин, фолиновую кислоту, оксалиплатин, низкомолекулярный ингибитор, иммунная клетка, природные клетки-киллеры, лимфокин-активированные клетки-киллеры, цитотоксические Т-клетки, дендритные клетки, радиация 4000 сГр, спасение аутологичных стволовых клеток, трансплантация стволовых клеток, трансплантация костного мозга, трансплантации гемопоэтических стволовых клеток (HSCT), CAR Т-клеточная терапия, тисагенлеклейсел, аксикабтаген силорейсел, цитарабин, высокие дозы цитарабина, даунорубицин (дауномицин), идарубицин, кладрибин, бортезомиб, карфилзомиб, талидомид, леналидомид, помалидомид, кортикостероиды, преднизон, дексаметазон, алкилирующий агент, хлорамбуцил, бендамустин, ифосфамид, лекарственное средство на основе платины, цисплатин, карбоплатин, оксалиплатин, пуриновый аналог, флударабин,

пентостатин, кладрибин, антимаболизит, гемцитабин, метотрексат, пралатрексат, винкристин, доксорубицин, митоксантрон, блеомицин, ингибитор протеасомы, ингибитор гистондеацетилазы, ромидепсин, белиностаб, киназный ингибитор, ибрутиниб, иделалисиб, антители, анти-CD20-антитело, ритуксимаб, обинтузумаб, офатумумаб, ибритумомаб, тиуксетан, анти-CD52-антитело, алемтузумаб, анти-CD30-антитело, брентуксимаб, ведотин, интерферон, иммуномодулирующий агент, талидомид, CHOP, CHOP+R (или R-CHOP), CVP, EPOCH, EPOCH + R, DHAP, DHAP + R (или R-DHAP), венетоклакс, метилпреднизолон или ингибитор тирозинкиназы Брутона (BTKi).

28. Способ по любому из пп. 1-27, в котором донором или объектом является человек.

29. Способ по любому из пп. 1-28, дополнительно включающий анализ клеток перед криогенным хранением, необязательно путем оценки поверхностной экспрессии клеток для одного или нескольких фенотипических маркеров.

30. Способ по любому из пп. 1-29, дополнительно включающий оттаивание клеток, хранящихся в криогенных условиях.

31. Способ по любому из пп. 1-30, дополнительно включающий, после криогенного хранения и/или оттаивания клеток, конструирование клеток для экспрессии рекомбинантной или экзогенной молекулы, которая необязательно представляет собой рекомбинантный белок, необязательно рекомбинантный рецептор, который необязательно представляет собой или содержит Т-клеточный рецептор (TCR), химерный рецептор и/или химерный антигенный рецептор.

32. Способ по п. 31, в котором рекомбинантная молекула представляет собой рекомбинантный рецептор, который специфически распознает или связывается с антигеном, экспрессируемым или специфически экспрессируемым клетками, ассоциированными с заболеванием или состоянием.

33. Способ по любому из пп. 1-32, в котором количество клеток, когда их забирают у донора или объекта и/или общее количество в образце афереза, составляет или составляет около, или составляет не более чем или около 500×10^6 , 1000×10^6 , 2000×10^6 , 3000×10^6 , 4000×10^6 , или 5000×10^6 или более тотальных клеток или тотальных ядродержащих клеток.

34. Способ по любому из пп. 1-33, дополнительно включающий обогащение Т-клеток из образца до криогенного хранения образца.

35. Способ по п. 34, в котором Т-клетки представляют собой или содержат или обогащены по $CD4^+$ Т-клеткам или их подмножеству, $CD8^+$ Т-клеткам или их подмножеству или их смеси, необязательно, где подмножество $CD8^+$ клеток и/или

подмножество $CD4^+$ клеток необязательно выбирают из группы, состоящей из клеток памяти, Т-клеток центральной памяти (T_{CM}), клеток эффекторной памяти (T_{EM}), стволовых клеток центральной памяти (T_{SCM}), эффекторных Т-клеток (T_E), Т-клеток эффекторной памяти RA (T_{EMRA}), наивных Т-клеток (T_N) и/или регуляторных Т-клеток (T_{REG}) и/или где образец обогащен по Т-клеткам.

36. Способ по любому из пп. 1-35, дополнительно включающий приготовление образца в криогенной среде перед криогенным хранением образца.

37. Способ по любому из пп. 1-36, дополнительно включающий доставку клеток в хранилище либо до, либо после криогенного замораживания.

38. Способ по п. 37, в котором хранилище является центральным или общим репозиторным хранилищем.

39. Способ по п. 37 или 38, в котором образец отправляют в охлаждаемой среде в хранилище.

40. Способ по любому из пп. 36-39, дополнительно включающий обогащение Т-клеток из образца после доставки и до криогенного хранения клеток.

41. Способ по п. 40, в котором Т-клетки представляют собой или содержат или обогащены по $CD4^+$ Т-клеткам или их подмножеству, $CD8^+$ Т-клеткам или их подмножеству или их смеси, необязательно, где подмножество $CD8^+$ клеток и/или подмножество $CD4^+$ клеток необязательно выбрано из группы, состоящей из клеток памяти, Т-клеток центральной памяти (T_{CM}), клеток эффекторной памяти (T_{EM}), стволовых клеток центральной памяти (T_{SCM}), эффекторных Т-клеток (T_E), Т-клеток эффекторной памяти RA (T_{EMRA}), наивных Т-клеток (T_N) и/или регуляторных Т-клеток (T_{REG}) и/или содержат Т-клетки.

42. Способ по п. 40 или 41, дополнительно включающий приготовление образца и/или Т-клеток в криогенной среде после доставки и до криогенного хранения клеток.

43. Способ по любому из пп. 1-42, дополнительно включающий оттаивание клеток, хранящихся в криогенных условиях.

44. Способ по любому из пп. 1-43, в котором образец помещают в контейнер, помеченный одним или несколькими кодами или идентификаторами, для каталогизации клеток во время обработки, криоконсервации и/или хранения.

45. Способ по п. 44, в котором один или несколько кодов или идентификаторов содержат текстовые идентификаторы, штрих-коды, QR-коды, RFID или транспондеры.

46. Способ по п. 44 или п. 45, в котором один или несколько кодов или идентификаторов соответствуют или указывают идентичность одного или нескольких из числа: донора, образца, флакона, контейнера, заболевания и/или хранилища.

47. Способ по любому из пп. 44-46, в котором один или несколько кодов или идентификаторов соответствуют коду, появляющемуся на браслете, удостоверяющем личность пациента, или в больничной, медицинской системе или документации или в системе или документации учреждения для сбора.

48. Способ лечения, включающий:

получение и необязательно оттаивание криогенно хранящихся клеток способами по любому из пп. 1-47, в которых до указанного получения клетки криогенно хранили в течение периода, по меньшей мере, равного 12 часам, 24 часам, 36 часам, 48 часам, 1 неделе, 2 неделям, 3 неделям или 4 неделям, 1 месяцу, 2 месяцам, 3 месяцам, 4 месяцам, 5 месяцам, 6 месяцам, 7 месяцам, 8 месяцам, 9 месяцам, 10 месяцам, 11 месяцам, 1 году, 2 годам, 3 годам, 4 годам, 5 годам, 6 годам, 7 годам, 8 годам, 9 годам, 10 годам, 11 годам, 12 годам, 13 годам, 14 годам, 15 годам, 16 годам, 17 годам, 18 годам, 19 годам, 20 годам, 25 годам, 30 годам, 35 годам или 40 годам

- введение рекомбинантного рецептора в стимулированную композицию, что тем самым приводит к получению сконструированной композиции, содержащей сконструированные Т-клетки, и

введение клеток объекту.

49. Способ по любому из пп. 1-48, в котором лечение не включает сконструированные Т-клетки или клетки криогенно-замороженной композиции.