

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(21) **202091089** (13) **A1**

**(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки  
2020.10.02

(51) Int. Cl. *C12N 5/0783* (2010.01)  
*C07K 14/725* (2006.01)

(22) Дата подачи заявки  
2018.10.31

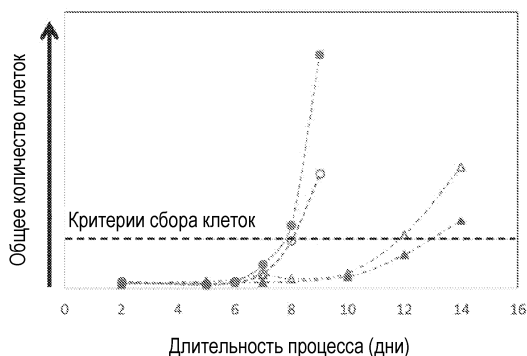
**(54) СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ ТЕРАПЕВТИЧЕСКИХ КОМПОЗИЦИЙ  
МОДИФИЦИРОВАННЫХ КЛЕТОК**

(31) 62/580,409; 62/596,771; 62/721,603  
(32) 2017.11.01; 2017.12.08; 2018.08.22  
(33) US  
(86) PCT/US2018/058590  
(87) WO 2019/089855 2019.05.09  
(71) Заявитель:  
ДЖУНО ТЕРАПЬЮТИКС, ИНК. (US)

(72) Изобретатель:  
Ли Сара И., Бошен Паскаль,  
Бонихади Марк Л., Крисман Райан Л.,  
Ларсон Райан П., Мэллэни Мэри,  
Рамсбург Кристофер Глен, Вебер  
Клинтон, Веснер Джон Мэттью, Йи  
Нейтан (US)

(74) Представитель:  
Медведев В.Н. (RU)

(57) В настоящем изобретении предложены способы генетической модификации Т-клеток, таких как CD4+ Т-клетки, для применения в клеточной терапии. В некоторых аспектах предложенные способы включают один или несколько этапов инкубирования клеток при стимулирующих условиях, введение рекомбинантного полипептида в клетки посредством трансдукции или трансфекции и культивирование клеток при условиях, которые вызывают пролиферацию и/или размножение. В некоторых аспектах инкубирование и/или культивирование проводят в присутствии рекомбинантного ИЛ-2. В некоторых аспектах предложенные способы представляют собой эффективные, надежные средства для получения генетически модифицированных Т-клеток с высокой степенью успеха.



**A1**

**202091089**

**202091089**

**A1**

## ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-562701EA/032

### СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ ТЕРАПЕВТИЧЕСКИХ КОМПОЗИЦИЙ МОДИФИЦИРОВАННЫХ КЛЕТОК

#### Перекрестная ссылка на родственные заявки

[0001] Настоящая заявка испрашивает приоритет предварительной заявки на патент США 62/580,409, поданной 1 ноября 2017 года, озаглавленной "СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ ТЕРАПЕВТИЧЕСКИХ КОМПОЗИЦИЙ МОДИФИЦИРОВАННЫХ КЛЕТОК", предварительной заявки на патент США 62/596,771, поданной 8 декабря 2017 года, озаглавленной "СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ ТЕРАПЕВТИЧЕСКИХ КОМПОЗИЦИЙ МОДИФИЦИРОВАННЫХ КЛЕТОК" и предварительной заявки на патент США 62/721,603, поданной 22 августа 2018 года, озаглавленной "СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ ТЕРАПЕВТИЧЕСКИХ КОМПОЗИЦИЙ МОДИФИЦИРОВАННЫХ КЛЕТОК", содержание которых во всех отношениях включено посредством отсылок во всей их полноте.

#### Включение списка последовательностей посредством отсылки

[0002] Настоящая заявка подана со Списком последовательностей в электронном формате. Список последовательностей предоставлен в файле под именем 735042013240SeqList.txt, созданном 31 октября 2018 года, который имеет размер 35994 байта. Данные Списка последовательностей в электронном формате включены посредством отсылки во всей полноте.

#### Область техники, к которой относится изобретение

[0003] В настоящем изобретении предложены способы генетической модификации Т-клеток, таких как CD4<sup>+</sup> Т-клетки и/или CD8<sup>+</sup> Т-клетки, для применения в клеточной терапии. В некоторых аспектах предложенные способы включают один или более этапов инкубирования клеток в стимулирующих условиях, введения рекомбинантного полипептида в клетки посредством трансдукции или трансфекции и культивирования клеток в условиях, которые способствуют пролиферации и/или размножению. В некоторых аспектах инкубирование и/или культивирование проводят в присутствии рекомбинантного ИЛ-2. В некоторых аспектах предложенные способы представляют собой эффективное, надежное средство для получения генетически модифицированных Т-клеток с высокой степенью успеха.

#### Уровень техники

[0004] Различные способы клеточной терапии доступны для лечения заболеваний и состояний. Способы клеточной терапии включают способы с применением иммунных клеток, таких как Т-клетки, генетически модифицированные рекомбинантным рецептором, таким как химерные антигенные рецепторы. Существует потребность в усовершенствованных способах производства и/или создания таких клеточных терапий, в том числе для получения более эффективного способа и/или улучшенной клеточной композиции в качестве продукта. Предложены способы, наборы и изделия,

удовлетворяющие такие потребности.

#### Сущность изобретения

[0005] В некоторых аспектах предложены способы получения композиции модифицированных клеток, включающие: (а) инкубирование в стимулирующих условиях исходной композиции, содержащей Т-клетки, обогащенные CD4+ первичными Т-клетками человека, где указанные стимулирующие условия включают присутствие (i) стимулирующего реагента, способного активировать один или более внутриклеточных сигнальных доменов одного или более компонентов комплекса TCR и/или один или более внутриклеточных сигнальных доменов одной или более костимулирующих молекул и (ii) одного или более цитокинов, где по меньшей мере один цитокин представляет собой или включает рекомбинантный человеческий IL-2, с получением, таким образом, стимулированной композиции; и (b) введение рекомбинантного рецептора в стимулированную композицию с получением, таким образом, модифицированной композиции, содержащей модифицированные Т-клетки.

[0006] В некоторых вариантах осуществления способов, предложенных в настоящем документе, исходная композиция включает больше чем или больше чем приблизительно 70%, больше чем или больше чем приблизительно 75%, больше чем или больше чем приблизительно 80%, больше чем или больше чем приблизительно 85%, больше чем или больше чем приблизительно 90%, больше чем или больше чем приблизительно 95% или больше чем или больше чем приблизительно 98% CD4+ первичных человеческих Т-клеток; и/или исходная композиция состоит по существу из CD4+ первичных человеческих Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления концентрация рекомбинантного IL-2 составляет от 10 МЕ/мл до 200 МЕ/мл или от приблизительно 10 до приблизительно 200 МЕ/мл. В некоторых вариантах осуществления способов, предложенных в настоящем документе, один или более цитокинов дополнительно включают IL-7 и/или IL-15, где концентрация IL-7 необязательно составляет от 100 МЕ/мл до 1000 МЕ/мл или от приблизительно 100 МЕ/мл до приблизительно 1000 МЕ/мл, и/или концентрация IL-15 от 1 МЕ/мл до 50 МЕ/мл или от приблизительно 1 МЕ/мл до приблизительно 50 МЕ/мл. В некоторых вариантах осуществления способов, предложенных в настоящем документе, инкубирование проводят в присутствии одного или более антиоксидантов.

[0007] В некоторых аспектах предложены способы получения композиции модифицированных клеток, включающие: (а) инкубирование исходной композиции, содержащей Т-клетки, обогащенные CD4+ и/или CD8+ первичными человеческими Т-клетками, с получением, таким образом, стимулированной композиции, где инкубирование проводят: (1) при одном или более стимулирующих условиях, где указанные стимулирующие условия включают присутствие (i) стимулирующего реагента, способного к активации одного или более внутриклеточных сигнальных доменов одного или более компонентов комплекса TCR и/или одного или более внутриклеточных сигнальных доменов одной или более костимулирующих молекул и (ii) одного или более

цитокинов; и/или (2) в присутствии одного или более антиоксидантов; и (b) введение рекомбинантного рецептора в стимулированную композицию с получением, таким образом, модифицированной композиции, содержащей модифицированные Т-клетки.

[0008] В некоторых вариантах осуществления способов, предложенных в настоящем документе, исходная композиция включает больше чем или больше чем приблизительно 70%, больше чем или больше чем приблизительно 75%, больше чем или больше чем приблизительно 80%, больше чем или больше чем приблизительно 85%, больше чем или больше чем приблизительно 90%, больше чем или больше чем приблизительно 95% или больше чем или больше чем приблизительно 98% CD4+ и/или CD8+ первичных человеческих Т-клеток; и/или исходная композиция состоит по существу из CD4+ и/или CD8+ первичных человеческих Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления способов, предложенных в настоящем документе, один или более цитокинов выбраны из рекомбинантного IL-2, рекомбинантного IL-7 и/или рекомбинантного IL-15. В некоторых вариантах осуществления концентрация рекомбинантного IL-2 составляет от 10 до 200 МЕ/мл или от приблизительно 10 до приблизительно 200 МЕ/мл; концентрация рекомбинантного IL-7 составляет от 100 МЕ/мл до 1000 МЕ/мл или от приблизительно 100 МЕ/мл до приблизительно 1000 МЕ/мл; и/или концентрация рекомбинантного IL-15 составляет от 1 МЕ/мл до 25 МЕ/мл или от приблизительно 1 МЕ/мл до приблизительно 25 МЕ/мл.

[0009] В некоторых вариантах осуществления способов, предложенных в настоящем документе, исходная композиция включает больше чем приблизительно 70%, больше чем или больше чем приблизительно 75%, больше чем или больше чем приблизительно 80%, больше чем или больше чем приблизительно 85%, больше чем или больше чем приблизительно 90%, больше чем или больше чем приблизительно 95% или больше чем или больше чем приблизительно 98% CD4+ первичных человеческих Т-клеток; и/или исходная композиция состоит по существу из CD4+ первичных человеческих Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления один или более цитокинов выбраны из рекомбинантного IL-2, рекомбинантного IL-7 и рекомбинантного IL-15. В некоторых вариантах осуществления исходная композиция включает больше чем приблизительно 70%, больше чем или больше чем приблизительно 75%, больше чем или больше чем приблизительно 80%, больше чем или больше чем приблизительно 85%, больше чем или больше чем приблизительно 90%, больше чем или больше чем приблизительно 95% или больше чем или больше чем приблизительно 98% CD8+ первичных человеческих Т-клеток; и/или исходная композиция состоит по существу из CD8+ первичных человеческих Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления способов, предложенных в настоящем документе, один или более цитокинов выбраны из рекомбинантного IL-2 и рекомбинантного IL-15.

[0010] В некоторых вариантах осуществления способов, предложенных в настоящем документе, стимулирующий реагент включает основное средство, которое специфично связывается с членом комплекса TCR, которое необязательно специфично

связывается с CD3. В некоторых вариантах осуществления стимулирующий реагент дополнительно включает дополнительное средство, которое специфично связывается с Т-клеточной костимулирующей молекулой, где костимулирующая молекула необязательно выбрана из CD28, CD137 (4-1-BB), OX40 или ICOS. В некоторых вариантах осуществления способов, предложенных в настоящем документе, основные и/или дополнительные средства включают антитело, где стимулирующий реагент необязательно включает инкубирование с антителом против CD3 и антителом против CD28 или их антигенсвязывающим фрагментом. В некоторых вариантах осуществления основное средство и/или дополнительное средство присутствует на поверхности твердой подложки.

[0011] В некоторых вариантах осуществления способов, предложенных в настоящем документе, твердая подложка представляет собой или включает сферу. В некоторых вариантах осуществления сфера имеет диаметр больше чем или больше чем приблизительно 3,5 мкм, но не больше чем приблизительно 9 мкм или не больше чем приблизительно 8 мкм, или не больше чем приблизительно 7 мкм, или не больше чем приблизительно 6 мкм, или не больше чем приблизительно 5 мкм. В некоторых вариантах осуществления сфера имеет диаметр 4,5 мкм или приблизительно 4,5 мкм. В некоторых вариантах осуществления сфера является инертной. В некоторых вариантах осуществления сфера представляет собой или включает полистирольную поверхность. В некоторых вариантах осуществления сфера является магнитной или суперпарамагнитной. В некоторых вариантах осуществления отношение сфер к клеткам составляет меньше 3:1 или меньше чем приблизительно 3:1. В некоторых вариантах осуществления отношение сфер к клеткам составляет от 2:1 до 0,5:1 или от приблизительно 2:1 до приблизительно 0,5:1. В некоторых вариантах осуществления отношение сфер к клеткам составляет 1:1 или приблизительно 1:1.

[0012] В некоторых вариантах осуществления способов, предложенных в настоящем документе, один или более антиоксидантов включают серосодержащий антиоксидант. В некоторых вариантах осуществления один или более антиоксидантов включают предшественник глутатиона. В некоторых вариантах осуществления один или более антиоксидантов включают N-ацетилцистеин (NAC), где NAC необязательно содержится в концентрации от 0,2 мг/мл до 2,0 мг/мл или от приблизительно 0,2 мг/мл до приблизительно 2,0 мг/мл.

[0013] В некоторых вариантах осуществления способов, предложенных в настоящем документе, введение включает трансдукцию клеток стимулированной композиции вирусным вектором, содержащим полинуклеотид, кодирующий рекомбинантный рецептор. В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор является ретровирусным вектором. В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор является лентивирусным вектором или гаммаретровирусным вектором. В некоторых вариантах осуществления способов, предложенных в настоящем документе, введение проводят в присутствии вещества, способствующего трансдукции. В некоторых вариантах осуществления вещество, способствующее трансдукции, представляет собой

или включает протамина сульфат, необязательно от 1 мкг/мл до 50 мкг/мл или от приблизительно 1 мкг/мл до приблизительно 50 мкг/мл протамина сульфата; производное фибронектина, способствующее трансдукции; и/или RetroNectin. В других вариантах осуществления способов, предложенных в настоящем документе, введение включает трансфекцию клеток стимулированной композиции вектором, содержащим полинуклеотид, кодирующий рекомбинантный рецептор. В некоторых вариантах осуществления вектор является транспозоном, необязательно транспозоном Спящая красавица (SB) или транспозон Piggybac.

[0014] В некоторых вариантах осуществления способов, предложенных в настоящем документе, способ дополнительно включает культивирование модифицированной композиции при условиях, вызывающих пролиферацию или размножение модифицированных клеток, с получением, таким образом, готовой композиции, содержащей модифицированные Т-клетки. В некоторых вариантах осуществления культивирование проводят в присутствии одного или более цитокинов, где по меньшей мере один цитокин представляет собой или включает рекомбинантный человеческий IL-2. В некоторых вариантах осуществления стимулирующий реагент удаляют из модифицированной композиции перед культивированием.

[0015] В некоторых вариантах осуществления стимулирующее средство удаляют в течение или меньше чем 7 дней после начала инкубирования. В некоторых вариантах осуществления стимулирующий реагент удаляют от 3 дней до 6 дней или от приблизительно 3 дней до приблизительно 6 дней после начала инкубирования. В некоторых вариантах осуществления стимулирующий реагент удаляют через 4 дня или приблизительно через 4 дня после начала инкубирования. В некоторых вариантах осуществления удаление сфер включает воздействие на клетки модифицированной композиции магнитного поля.

[0016] В других аспектах предложены способы получения композиции модифицированных клеток, где способ включает культивирование, в присутствии одного или более цитокинов, композиции модифицированных клеток, содержащей CD4+ первичные человеческие Т-клетки, которые включают клетки, модифицированные рекомбинантным рецептором, где по меньшей мере один цитокин представляет собой или включает рекомбинантный человеческий IL-2; где способ приводит к пролиферации или размножению клеток в композиции с получением готовой композиции, содержащей, модифицированные CD4+ клетки. В некоторых вариантах осуществления пролиферация или размножение приводит к, приблизительно к или по меньшей мере к 2-кратному, 3-кратному, 4-кратному, 5-кратному или больше чем 5-кратному увеличению количества CD4+ Т-клеток, модифицированных рекомбинантным рецептором.

[0017] В некоторых вариантах осуществления любого из способов, предложенных в настоящем документе, композиция модифицированных клеток включает больше чем приблизительно 70%, больше чем или больше чем приблизительно 75%, больше чем или больше чем приблизительно 80%, больше чем или больше чем приблизительно 85%,

больше чем или больше чем приблизительно 90%, больше чем или больше чем приблизительно 95% или больше чем или больше чем приблизительно 98% CD4+ первичных человеческих Т-клеток или экспрессирующих рекомбинантный рецептор CD4+ клеток; и/или композиция модифицированных клеток состоит по существу из CD4+ первичных человеческих Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления способов, предложенных в настоящем документе, концентрация рекомбинантного IL-2 составляет от 50 МЕ/мл до 500 МЕ/мл или от приблизительно 50 МЕ/мл до приблизительно 500 МЕ/мл. В некоторых вариантах осуществления любого из способов, предложенных в настоящем документе, один или более цитокинов дополнительно включает IL-7 и/или IL-15, где, необязательно, концентрация IL-7 составляет от 500 МЕ/мл до 2000 МЕ/мл или от приблизительно 500 МЕ/мл до приблизительно 2000 МЕ/мл, и/или концентрация IL-15 составляет от 5 МЕ/мл до 50 МЕ/мл или от приблизительно 5 МЕ/мл до приблизительно 50 МЕ/мл.

[0018] В некоторых вариантах осуществления любого из способов, предложенных в настоящем документе, композицию модифицированных клеток получают способом, включающим: инкубирование, при стимулирующих условиях, исходной композиции, содержащей первичные Т-клетки, обогащенные CD4+ первичными человеческими Т-клетками, где указанные стимулирующие условия включают присутствие (i) стимулирующего реагента, способного к активации одного или более внутриклеточных сигнальных доменов одного или более компонентов комплекса TCR и/или одного или более внутриклеточных сигнальных доменов одной или более костимулирующих молекул и (ii) одного или более цитокинов, где по меньшей мере один цитокин представляет собой или включает рекомбинантный человеческий IL-2, с получением, таким образом, стимулированной композиции; и (b) введение рекомбинантного рецептора в стимулированную композицию с получением, таким образом, модифицированной композиции, содержащей модифицированные Т-клетки.

[0019] В некоторых вариантах осуществления любого из способов, предложенных в настоящем документе, исходная композиция включает больше чем или больше чем приблизительно 70%, больше чем или больше чем приблизительно 75%, больше чем или больше чем приблизительно 80%, больше чем или больше чем приблизительно 85%, больше чем или больше чем приблизительно 90%, больше чем или больше чем приблизительно 95% или больше чем или больше чем приблизительно 98% CD4+ первичных человеческих Т-клеток; и/или исходная композиция состоит по существу из CD4+ первичных человеческих Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления любого из способов, предложенных в настоящем документе, один или более цитокинов дополнительно включает IL-7 и/или IL-15. В некоторых вариантах осуществления любого из способов, предложенных в настоящем документе, культивирование проводят в присутствии поверхностно-активного вещества. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере часть культивирования проводят с непрерывным перемешиванием и/или перфузией.

[0020] В другом аспекте предложены способы получения композиции модифицированных клеток, включающие: культивирование, в присутствии одного или более цитокинов, композиции модифицированных клеток, содержащей CD4+ и/или CD8+ первичные человеческие Т-клетки, которые включают клетки, модифицированные рекомбинантным рецептором, где культивирование проводят в присутствии поверхностно-активного вещества, и/или по меньшей мере часть культивирования проводят с непрерывным перемешиванием и/или перфузией; где способ приводит к пролиферации или размножению клеток в композиции с получением готовой композиции, содержащей модифицированные CD4+ и/или CD8+ Т-клетки.

[0021] В некоторых вариантах осуществления любого из способов, описанных выше, композиция модифицированных клеток включает больше чем или больше чем приблизительно 70%, больше чем или больше чем приблизительно 75%, больше чем или больше чем приблизительно 80%, больше чем или больше чем приблизительно 85%, больше чем или больше чем приблизительно 90%, больше чем или больше чем приблизительно 95% или больше чем или больше чем приблизительно 98% CD4+ и/или CD8+ первичных человеческих Т-клеток или экспрессирующих рекомбинантные рецептор CD4+ и/или CD8+ первичных Т-клеток; и/или композиция модифицированных клеток состоит по существу из CD4+ и/или CD8+ первичных человеческих Т-клеток.

[0022] В некоторых вариантах осуществления любого из способов, предложенных в настоящем документе, пролиферация или размножение приводит к, приблизительно к или по меньшей мере к 2-кратному, 3-кратному, 4-кратному, 5-кратному или больше чем 5-кратному увеличению количества CD4+ и/или CD8+ Т-клеток, модифицированных рекомбинантным рецептором.

[0023] В некоторых вариантах осуществления любого из способов, предложенных в настоящем документе, один или более цитокинов выбраны из рекомбинантного IL-2, рекомбинантного IL-7 и/или рекомбинантного IL-15. В некоторых вариантах осуществления концентрация рекомбинантного IL-2 составляет от 50 МЕ/мл до 500 МЕ/мл или от приблизительно 50 МЕ/мл до приблизительно 500 МЕ/мл; концентрация рекомбинантного IL-7 составляет от 500 МЕ/мл до 2000 МЕ/мл или от приблизительно 500 МЕ/мл до приблизительно 2000 МЕ/мл; и/или концентрация рекомбинантного IL-15 составляет от 5 МЕ/мл до 50 МЕ/мл или от приблизительно 5 МЕ/мл до приблизительно 50 МЕ/мл.

[0024] В некоторых вариантах осуществления любого из способов, предложенных в настоящем документе, композиция модифицированных клеток включает больше чем приблизительно 70%, больше чем или больше чем приблизительно 75%, больше чем или больше чем приблизительно 80%, больше чем или больше чем приблизительно 85%, больше чем или больше чем приблизительно 90%, больше чем или больше чем приблизительно 95% или больше чем или больше чем приблизительно 98% CD4+ первичных человеческих Т-клеток или экспрессирующих рекомбинантный рецептор CD4+ первичных человеческих Т-клеток; и/или композиция модифицированных клеток



состоит по существу из CD4+ первичных человеческих Т-клеток.

[0025] В некоторых вариантах осуществления любого из способов, предложенных в настоящем документе, пролиферация или размножение приводит к, приблизительно к или по меньшей мере к 2-кратному, 3-кратному, 4-кратному, 5-кратному или больше чем 5-кратному увеличению количества CD8+ Т-клеток, модифицированных рекомбинантным рецептором. В некоторых вариантах осуществления один или более цитокинов выбраны из рекомбинантного IL-2, рекомбинантного IL-7 и рекомбинантного IL-15.

[0026] В некоторых вариантах осуществления любого из способов, предложенных в настоящем документе, композиция модифицированных клеток включает больше чем приблизительно 70%, больше чем или больше чем приблизительно 75%, больше чем или больше чем приблизительно 80%, больше чем или больше чем приблизительно 85%, больше чем или больше чем приблизительно 90%, больше чем или больше чем приблизительно 95% или больше чем или больше чем приблизительно 98% CD8+ первичных человеческих Т-клеток или экспрессирующих рекомбинантный рецептор CD8+ первичных человеческих Т-клеток; и/или композиция модифицированных клеток состоит по существу из CD8+ первичных человеческих Т-клеток.

[0027] В некоторых вариантах осуществления любого из способов, предложенных в настоящем документе, один или более цитокинов выбраны из рекомбинантного IL-2 и рекомбинантного IL-15. В некоторых вариантах осуществления любого из способов, предложенных в настоящем документе, поверхностно-активное вещество включает полоксамер, где, необязательно, полоксамер присутствует в концентрации от 0,5 мкл/мл до 5 мкл/мл или от приблизительно 0,5 мкл/мл до приблизительно 5 мкл/мл. В некоторых вариантах осуществления полоксамером является Полоксамер 188.

[0028] В некоторых вариантах осуществления любого из способов, предложенных в настоящем документе, композицию модифицированных клеток получают способом, включающим: инкубирование, при стимулирующих условиях, исходной композиции, содержащей первичные Т-клетки, обогащенные CD4+ и/или CD8+ первичными человеческими Т-клетками, где указанные стимулирующие условия включают присутствие (i) стимулирующего реагента, способного к активации одного или более внутриклеточных сигнальных доменов одного или более компонентов комплекса TCR и/или одного или более внутриклеточных сигнальных доменов одной или более костимулирующих молекул и (ii) одного или более цитокинов, с получением, таким образом, стимулированной композиции; и (b) введение рекомбинантного рецептора в стимулированную композицию с получением, таким образом, модифицированной композиции, содержащей модифицированные Т-клетки.

[0029] В некоторых вариантах осуществления любого из способов, предложенных в настоящем документе, исходная композиция включает больше чем или больше чем приблизительно 70%, больше чем или больше чем приблизительно 75%, больше чем или больше чем приблизительно 80%, больше чем или больше чем приблизительно 85%, больше чем или больше чем приблизительно 90%, больше чем или больше чем

приблизительно 95% или больше чем или больше чем приблизительно 98% CD4+ и/или CD8+ первичных человеческих Т-клеток; и/или исходная композиция состоит по существу из CD4+ и/или CD8+ первичных человеческих Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления один или более цитокинов выбраны из рекомбинантного IL-2, рекомбинантного IL-7 и/или рекомбинантного IL-15.

[0030] В некоторых вариантах осуществления любого из способов, предложенных в настоящем документе, исходная композиция включает больше чем приблизительно 70%, больше чем или больше чем приблизительно 75%, больше чем или больше чем приблизительно 80%, больше чем или больше чем приблизительно 85%, больше чем или больше чем приблизительно 90%, больше чем или больше чем приблизительно 95% или больше чем или больше чем приблизительно 98% CD4+ первичных человеческих Т-клеток; и/или исходная композиция состоит по существу из CD4+ первичных человеческих Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления один или более цитокинов выбраны из рекомбинантного IL-2, рекомбинантного IL-7 и рекомбинантного IL-15.

[0031] В некоторых вариантах осуществления любого из способов, предложенных в настоящем документе, исходная композиция включает больше чем приблизительно 70%, больше чем или больше чем приблизительно 75%, больше чем или больше чем приблизительно 80%, больше чем или больше чем приблизительно 85%, больше чем или больше чем приблизительно 90%, больше чем или больше чем приблизительно 95% или больше чем или больше чем приблизительно 98% CD8+ первичных человеческих Т-клеток; и/или исходная композиция состоит по существу из CD8+ первичных человеческих Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления один или более цитокинов выбраны из рекомбинантного IL-2 и рекомбинантного IL-15.

[0032] В некоторых вариантах осуществления любого из способов, предложенных в настоящем документе, стимулирующий реагент включает основное средство, которое специфично связывается с членом комплекса TCR, которое необязательно специфично связывается с CD3. В некоторых вариантах осуществления стимулирующий реагент дополнительно включает дополнительное средство, которое специфично связывается с Т-клеточной костимулирующей молекулой, где костимулирующая молекула необязательно выбрана из CD28, CD137 (4-1-BB), OX40 или ICOS.

[0033] В некоторых вариантах осуществления основные и/или дополнительные средства включают антитело, где стимулирующий реагент необязательно включает инкубирование с антителом против CD3 и антителом против CD28 или их антигенсвязывающим фрагментом. В некоторых вариантах осуществления основное средство и/или дополнительное средство присутствует на поверхности твердой подложки. В некоторых вариантах осуществления твердая подложка представляет собой или включает сферу. В некоторых вариантах осуществления сфера имеет диаметр больше чем или больше чем приблизительно 3,5 мкм, но не больше чем приблизительно 9 мкм или не больше чем приблизительно 8 мкм, или не больше чем приблизительно 7 мкм, или не больше чем приблизительно 6 мкм, или не больше чем приблизительно 5 мкм. В

некоторых вариантах осуществления сфера включает диаметр 4,5 мкм или приблизительно 4,5 мкм. В некоторых вариантах осуществления сфера является инертной. В некоторых вариантах осуществления сфера представляет собой или включает полистирольную поверхность. В некоторых вариантах осуществления сфера является магнитной или суперпарамагнитной. В некоторых вариантах осуществления отношение сфер к клеткам составляет меньше чем или меньше чем приблизительно 3:1. В некоторых вариантах осуществления отношение сфер к клеткам составляет от 2:1 до 0,5:1 или от приблизительно 2:1 до приблизительно 0,5:1. В некоторых вариантах осуществления отношение сфер к клеткам составляет 1:1 или приблизительно 1:1.

[0034] В некоторых вариантах осуществления любого из способов, предложенных в настоящем документе, инкубирование проводят в присутствии одного или более антиоксидантов. В некоторых вариантах осуществления один или более антиоксидантов включают серосодержащий антиоксидант. В некоторых вариантах осуществления один или более антиоксидантов включают предшественник глутатиона. В некоторых вариантах осуществления один или более антиоксидантов включают N-ацетилцистеин (NAC), где NAC необязательно содержится в концентрации от 0,2 мг/мл до 2,0 мг/мл или от приблизительно 0,2 мг/мл до приблизительно 2,0 мг/мл.

[0035] В некоторых вариантах осуществления любого из способов, предложенных в настоящем документе, введение включает трансдукцию клеток стимулированной композиции вирусным вектором, содержащим полинуклеотид, кодирующий рекомбинантный рецептор. В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор является ретровирусным вектором. В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор является лентивирусным вектором или гаммаретровирусным вектором. В некоторых вариантах осуществления любого из способов, предложенных в настоящем документе, введение проводят в присутствии вещества, способствующего трансдукции. В некоторых вариантах осуществления вещество, способствующее трансдукции, представляет собой или включает протамина сульфат, необязательно от 1 мкг/мл до 50 мкг/мл или от приблизительно 1 мкг/мл до приблизительно 50 мкг/мл протамина сульфата; производное фибронектина, способствующее трансдукции; и/или RetroNectin. В некоторых вариантах осуществления любого из способов, предложенных в настоящем документе, введение включает трансфекцию клеток стимулированной композиции вектором, содержащим полинуклеотид, кодирующий рекомбинантный рецептор. В некоторых вариантах осуществления вектор является транспозоном, необязательно транспозоном Спящая красавица (SB) или транспозоном Piggybac.

[0036] В некоторых вариантах осуществления любого из способов, предложенных в настоящем документе, композиция модифицированных клеток не включает стимулирующий реагент, и/или стимулирующий реагент был по существу удален из композиции до культивирования, где указанный стимулирующий реагент содержит реагент, способный к активации одного или более внутриклеточных сигнальных доменов одного или более компонентов комплекса TCR и/или одного или более внутриклеточных

сигнальных доменов одной или более костимулирующих молекул.

[0037] В некоторых вариантах осуществления любого из способов, предложенных в настоящем документе, культивирование проводят, по меньшей мере, до тех пор, пока готовая композиция не будет включать пороговое количество Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления культивирование продолжают в течение по меньшей мере одного дня после достижения порогового количества Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления пороговое количество по меньшей мере в 2 раза, по меньшей мере в 3 раза, по меньшей мере в 4 раза, по меньшей мере в 5 или более раз превышает количество в композиции модифицированных клеток до культивирования. В некоторых вариантах осуществления любого из способов, предложенных в настоящем документе, культивирование проводят в течение от 2 дней до 10 дней включительно и/или культивирование проводят в течение по меньшей мере 10 дней. В некоторых вариантах осуществления любого из способов, предложенных в настоящем документе, после культивирования клетки готовой композиции собирают. В некоторых вариантах осуществления промежутков времени между началом инкубирования и сбором клеток готовой композиции составляет от 7 дней до 15 дней или от приблизительно 7 дней до приблизительно 15 дней. В некоторых вариантах осуществления промежутков времени между началом инкубирования и сбором клеток готовой композиции составляет от 9 дней до 13 дней или от приблизительно 9 дней до приблизительно 13 дней. В некоторых вариантах осуществления промежутков времени между началом инкубирования и сбором клеток готовой композиции составляет от 8 дней до 13 дней или от приблизительно 8 дней до приблизительно 13 дней.

[0038] В некоторых вариантах осуществления любого из способов, предложенных в настоящем документе, способ дополнительно включает подготовку клеток готовой композиции для криоконсервации и/или введения субъекту, необязательно в присутствии фармацевтически приемлемого вспомогательного вещества. В некоторых вариантах осуществления клетки готовой композиции подготавливают в присутствии криопротектора. В некоторых вариантах осуществления криопротектор включает ДМСО. В некоторых вариантах осуществления клетки готовой композиции помещают в контейнер, необязательно флакон или мешок.

[0039] В некоторых вариантах осуществления любого из способов, предложенных в настоящем документе, способ дополнительно включает выделение CD4<sup>+</sup> и/или CD8<sup>+</sup> Т-клеток из биологического образца перед инкубированием. В некоторых вариантах осуществления выделение включает отбор клеток на основе поверхностной экспрессии CD4 и/или CD8, необязательно путем положительного или отрицательного отбора. В некоторых вариантах осуществления выделение включает проведение иммуноаффинного отбора. В некоторых вариантах осуществления биологический образец включает первичные Т-клетки, полученные у субъекта. В некоторых вариантах осуществления субъектом является человек. В некоторых вариантах осуществления биологический образец представляет собой или включает образец цельной крови, образец

лейкотромбоцитарного слоя, образец мононуклеарных клеток периферической крови (МКПК), нефракционированный образец Т-клеток, образец лимфоцитов, образец лейкоцитов, продукт афереза или продукт лейкофереза.

[0040] В некоторых вариантах осуществления любого из способов, предложенных в настоящем документе, рекомбинантный рецептор способен к связыванию с антигеном-мишенью, который ассоциирован с, является специфическим для и/или экспрессируется на клетке или ткани заболевания, нарушения или состояния. В некоторых вариантах осуществления заболевание, нарушение или состояние является инфекционным заболеванием или нарушением, аутоиммунным заболеванием, воспалительным заболеванием или опухолью или раком. В некоторых вариантах осуществления антиген-мишень является опухолевым антигеном. В некоторых вариантах осуществления антиген-мишень выбран из 5Т4, 8Н9, интегрин *avb6*, В7-Н6, антигена созревания В-клеток (BCMA), СА9, раково-тестикулярного антигена, карбоангидразы 9 (CAIX), CCL-1, CD19, CD20, CD22, РЭА, поверхностного антигена гепатита В, CD23, CD24, CD30, CD33, CD38, CD44, CD44v6, CD44v7/8, CD123, CD138, CD171, раково-эмбрионального антигена (РЭА), СЕ7, циклина, циклина А2, *c-Met*, двойного антигена, EGFR, эпителиального гликопротеина 2 (EPG-2), эпителиального гликопротеина 40 (EPG-40), ЕРНа2, эфрина В2, *erb-B2*, *erb-B3*, *erb-B4*, димеров *erbB*, EGFR vIII, эстрогенового рецептора, фетального AchR, рецептора фолата альфа, фолат-связывающего белка (FBP), FCRL5, FCRH5, фетального рецептора ацетилхолина, G250/CAIX, GD2, GD3, gp100, сопряженного с G-белком рецептора 5D (GPCR5D), *Her2/neu* (рецепторной тирозинкиназы *erbB2*), HMW-ММА, IL-22R-альфа, рецептора IL-13 альфа-2 (IL-13Ra2), рецептора с доменом вставки киназы (*kdr*), легкой цепи каппа, Льюис Y, молекулы клеточной адгезии L1 (L1-CAM), меланома-ассоциированного 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, предпочтительно экспрессируемого антигена меланомы (PRAME), PSCA, прогестеронового рецептора, сурвивина, ROR1, TAG72, tEGFR, рецепторов VEGF, VEGF-R2, белка опухоли Вильмса 1 (WT-1), патогенспецифического антигена и антигена, ассоциированного с универсальной меткой.

[0041] В некоторых вариантах осуществления любого из способов, предложенных в настоящем документе, рекомбинантный рецептор представляет собой или включает функциональный не-TCR антигенный рецептор или TCR или его антигенсвязывающий фрагмент. В некоторых вариантах осуществления любого из способов, предложенных в настоящем документе, рекомбинантный рецептор является химерным антигенным рецептором (CAR). В некоторых вариантах осуществления любого из способов, предложенных в настоящем документе, рекомбинантный рецептор представляет собой CAR против CD19. В некоторых вариантах осуществления химерный антигенный рецептор включает внеклеточный домен, содержащий антигенсвязывающий домен. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен представляет собой или

включает антитело или фрагмент антитела, который необязательно является одноцепочечным фрагментом. В некоторых вариантах осуществления фрагмент включает переменные области антитела, соединенные гибким линкером. В некоторых вариантах осуществления фрагмент включает scFv.

[0042] В некоторых вариантах осуществления любого из способов, предложенных в настоящем документе, химерный антигенный рецептор дополнительно включает спейсер и/или шарнирную область. В некоторых вариантах осуществления химерный антигенный рецептор включает внутриклеточную сигнальную область. В некоторых вариантах осуществления внутриклеточная сигнальная область включает внутриклеточный сигнальный домен. В некоторых вариантах осуществления внутриклеточный сигнальный домен представляет собой или включает первичный сигнальный домен, сигнальный домен, который способен к индукции первичного сигнала активации в Т-клетке, сигнальный домен компонента Т-клеточного рецептора (TCR) и/или сигнальный домен, содержащий иммунорецепторный тирозиновый активирующий мотив (ITAM). В некоторых вариантах осуществления внутриклеточный сигнальный домен представляет собой или включает внутриклеточный сигнальный домен цепи CD3, необязательно CD3-дзета (CD3 $\zeta$ ) цепи, или его сигнальную часть.

[0043] В некоторых вариантах осуществления любого из способов, предложенных в настоящем документе, химерный антигенный рецептор дополнительно включает трансмембранный домен, расположенный между внеклеточным доменом и внутриклеточной сигнальной областью. В некоторых вариантах осуществления внутриклеточная сигнальная область дополнительно включает костимулирующую сигнальную область. В некоторых вариантах осуществления костимулирующая сигнальная область включает внутриклеточный сигнальный домен Т-клеточной костимулирующей молекулы или ее сигнальную часть. В некоторых вариантах осуществления костимулирующая сигнальная область включает внутриклеточный сигнальный домен CD28, 4-1BB или ICOS или их сигнальную часть. В некоторых вариантах осуществления костимулирующая сигнальная область расположена между трансмембранным доменом и внутриклеточной сигнальной областью.

[0044] В некоторых вариантах осуществления любого из способов, предложенных в настоящем документе, готовая композиция, содержащая пороговое количество или большее количество клеток, получают из больше чем или больше чем приблизительно 85%, больше чем или больше чем приблизительно 90% или больше чем или больше чем приблизительно 95% итераций способа. В некоторых вариантах осуществления любого из способов, описанных в настоящем документе, способ проводят в течение меньше чем 21 дня включительно.

[0045] В других аспектах предложены композиции, содержащие модифицированные клетки, полученные способом, описанным в любом из вариантов осуществления в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления композиция дополнительно включает фармацевтически приемлемый носитель. В

некоторых вариантах осуществления композиция включает криопротектор, необязательно ДМСО.

[0046] В другом аспекте предложены изделия, содержащие любую из композиций, описанных в настоящем документе, и инструкции по введению готовой композиции субъекту. В некоторых вариантах осуществления изделия субъект имеет заболевание или состояние, где рекомбинантный рецептор необязательно специфично распознает или специфично связывается с антигеном, ассоциированным с или экспрессируемым, или присутствующим на клетках заболевания или состояния. В некоторых вариантах осуществления готовая композиция является композицией модифицированных CD4+ Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления готовая композиция является модифицированной композицией CD8+ Т-клеток.

[0047] В некоторых аспектах предложены изделия, содержащие композицию модифицированных CD4+ Т-клеток, полученную любым из способов, описанных в настоящем документе, композицию модифицированных CD8+ Т-клеток, полученную любым из способов, описанных в настоящем документе, и инструкции по введению модифицированных CD4+ Т-клеток и модифицированных CD8+ Т-клеток субъекту. В некоторых вариантах осуществления инструкции указывают отдельно вводить CD4+ Т-клетки и CD8+ Т-клетки субъекту. В других вариантах осуществления инструкции указывают вводить CD4+ Т-клетки и CD8+ Т-клетки субъекту в требуемом соотношении.

[0048] В некоторых вариантах осуществления любого из способов, описанных в настоящем документе, способ проводят в течение меньше чем 21 дня включительно.

#### Краткое описание чертежей

[0049] На **ФИГ. 1** показан график, на котором представлены общие количества клеток в композициях CD4+ (закрашенные символы) и CD8+ (незакрашенные символы) клеток, полученных из одного и того же образца лейкофереза, измеренные в разных точках времени в ходе стимуляции, трансдукции и размножения клеток во время альтернативного (треугольники) и примерного (круги) процессов получения клеток, экспрессирующих химерный антигенный рецептор (CAR) против CD19, описанных в Примере 1. Штриховая горизонтальная линия указывает пороговое количество клеток, требуемое для соответствия критериям сбора клеток.

[0050] На **ФИГ. 2A-2D** показано количество жизнеспособных клеток ( $VCC; \times 10^6$  клеток/мл) и жизнеспособность клеток (%), оцениваемые при использовании непрерывного мониторинга методом дифференциальной ДНМ ("непрерывный", линия) или отбора вручную ("ручной", точки, в CD4+ клетках Донора 1 из Эксперимента 1 (**ФИГ. 2A**), Донора 2 из Эксперимента 1 (**ФИГ. 2B**) или Донора 3 из Эксперимента 2 (**ФИГ. 2C**) или CD8+ клетки от Донора Эксперимента 2 3 (**ФИГ. 2D**). На панелях сверху показаны измерения для каждого, на панелях снизу показан линейный регрессионный анализ и  $R^2$  и наклон(ы) для сравнения непрерывного контроля и ручного отбора.

[0051] На **ФИГ. 3** показано количество жизнеспособных клеток ( $VCC; \times 10^6$  клеток/мл) и жизнеспособность клеток (%), оцениваемые при использовании

непрерывного контроля методом дифференциальной ДНМ в автоматизированном процессе размножения по сравнению с ручным процессом размножения.

#### Подробное описание

[0052] В настоящем документе предложены способы создания или получения композиций модифицированных клеток, таких как модифицированные CD4+ и/или CD8+ Т-клетки, которые экспрессируют рекомбинантный рецептор. В конкретных вариантах осуществления способы применяются в отношении процесса, который включает инкубирование клеток в стимулирующих условиях; генетическую модификацию клеток, например, путем введения полинуклеотида, кодирующего рекомбинантный рецептор, и/или культивирования модифицированных клеток в условиях, которые способствуют пролиферации и/или размножению клеток. В некоторых вариантах осуществления клетки представляют собой композицию клеток, обогащенную CD4+ Т-клетками (в настоящем документе также именуемую композицией обогащенных CD4+ Т-клеток). В некоторых вариантах осуществления клетки представляют собой композицию клеток, обогащенную CD8+ Т-клетками (в настоящем документе также именуемую композицией обогащенных CD8+ Т-клеток). В некоторых вариантах осуществления способы проводят для создания или получения двух или отдельных композиций модифицированных Т-клеток, где каждая из них модифицирована одним и тем же рекомбинантным рецептором из клеток одного и того же биологического образца (например, от одного и того же субъекта), например, путем отдельного инкубирования, конструирования и культивирования отдельных композиций CD4+ Т-клеток и CD8+ Т-клеток.

[0053] Доступны различные способы создания популяций генетически модифицированных Т-клеток, в том числе для создания модифицированных Т-клеток, которые экспрессируют химерный антигенный рецептор. Однако в некоторых вариантах осуществления для некоторых из этих способов может потребоваться длительное или относительно длительное время для создания модифицированных клеток. В некоторых вариантах осуществления некоторые из существующих способов могут отличаться временем, необходимым для создания модифицированных Т-клеток из образцов, полученных от разных субъектов. Например, в некоторых вариантах осуществления один и тот же способ может потребовать на 5, 6, 7 или более дней больше для создания модифицированных клеток для одного субъекта, чем для другого субъекта. В некоторых вариантах осуществления некоторые способы могут различаться по своей способности успешно создавать сконструированные клетки, подходящие для терапии у разных субъектов. В конкретных вариантах осуществления изменчивость и/или непредсказуемость некоторых процессов могут представлять проблемы для клинических работников, например, такие как сложность определения, можно ли проводить клеточную терапию у данного субъекта, или, например, сложность при планировании или координации применения клеточной терапии, когда не известны сроки ее доступности.

[0054] Предложенные варианты осуществления решают одну или несколько из этих проблем. В конкретных вариантах осуществления предложенные способы



позволяют создавать модифицированные Т-клетки, подходящие для терапии, например, аутологичной клеточной терапии, за короткое или относительно короткое время по сравнению с некоторыми существующими способами. Кроме того, в некоторых вариантах осуществления предложенные способы приводят к более единообразному и менее вариабельному процессу с точки зрения длительности периода времени, необходимого для получения модифицированных клеток из образцов, отобранных у различных субъектов. В конкретных вариантах осуществления предложенные способы успешно обеспечивают создание модифицированных Т-клеток, подходящих для клеточной терапии, у большого числа субъектов. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления способы, описанные в настоящем документе, обеспечивают относительно быстрое и эффективное средство для создания модифицированных Т-клеток для терапии. Такие особенности могут позволять лечить больше потенциальных субъектов с применением Т-клеточной терапии, такой как аутологичная Т-клеточная терапия, и могут уменьшать некоторые трудности, связанные с планированием и координацией клеточной терапии у субъекта.

[0055] В некоторых вариантах осуществления предложенные способы уменьшают длительность размножения и/или позволяют получать продукт в более узком окне длительности по сравнению с другими продуктами и в более широком диапазоне исходных образцов (включая образцы, в которых пороговые показатели для сбора не могут быть достигнуты иным путем), и в некоторых аспектах может уменьшить неудачи из-за плохого размножения клеток.

[0056] В некоторых вариантах осуществления предложенные способы применяются в отношении процесса создания модифицированных CD4<sup>+</sup> Т-клеток, которые экспрессируют рекомбинантный рецептор, например химерный антигенный рецептор. В конкретных вариантах осуществления CD4<sup>+</sup> Т-клетки инкубируют и/или культивируют в присутствии рекомбинантного ИЛ-2. Как правило, альтернативные способы получения модифицированных CD4<sup>+</sup> Т-клеток не включают или не требуют добавления рекомбинантного ИЛ-2 с CD4<sup>+</sup> Т-клетками, поскольку в некоторых вариантах осуществления обычно подразумевается, что культивируемые CD4<sup>+</sup> Т-клетки продуцируют и/или секретируют ИЛ-2. Однако, без ограничения теорией, некоторые варианты осуществления предусматривают, что CD4<sup>+</sup> Т-клетки, полученные у некоторых пациентов, таких как больные субъекты и/или субъекты, у которых Т-клетки содержат один или более признаков, ассоциированных с пораженными клетками, не продуцируют или не секретируют ИЛ-2 в достаточных количествах. В некоторых вариантах осуществления такие CD4<sup>+</sup> Т-клетки не смогут расти, пролиферировать и/или размножаться без добавления рекомбинантного ИЛ-2. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления при включении рекомбинантного ИЛ-2 в процесс культивирования и модификации CD4<sup>+</sup> Т-клеток предложенные способы расширяют пул субъектов, которые могут предоставлять CD4<sup>+</sup> Т-клетки, которые могут быть модифицированы, и, таким образом, расширяют пул субъектов, которых можно лечить с

применением аутологичной клеточной терапии, содержащей модифицированные CD4+ Т-клетки.

[0057] В некоторых вариантах осуществления клетки инкубируют в стимулирующих условиях со стимулирующим реагентом, например, со сферой, конъюгированной с антителом против CD3 и против CD28, перед генетической модификацией, например трансдукцией или трансфекцией, клеток. В некоторых вариантах осуществления стимулирующий реагент отделяют или удаляют от клеток до начала этапа культивирования и в течение 7 дней или ранее, например, 4 дней или 5 дней или приблизительно 4 дней или 5 дней после начала инкубирования. Конкретные варианты осуществления предусматривают, что, когда стимулирующий реагент удаляют или отделяют от клеток в более ранний момент в ходе процесса, тогда клетки демонстрируют улучшенную выживаемость и более эффективно подвергаются пролиферации и/или размножению в ходе этапа культивирования, чем клетки, культивированные в альтернативных процессах, в которых не отделяют или удаляют стимулирующий реагент, либо делают это позже в ходе процесса. В таких вариантах осуществления культивируемые клетки достигают целевого или порогового количества клеток, плотности и/или экспансии быстрее, чем клетки, культивированные в альтернативных процессах. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления, удаление или отделение стимулирующего реагента от клеток в течение 7 дней или раньше от начала или иницирования инкубирования позволяет завершить процесс создания или получения модифицированных клеток в течение более короткого промежутка времени, чем альтернативные процессы.

[0058] В некоторых вариантах осуществления способы, предложенные в настоящем документе, применяются в отношении процесса, который позволяет создавать генетически модифицированные Т-клетки в течение короткого промежутка времени. В некоторых вариантах осуществления малая длительность процесса может увеличивать скорость, частоту и/или вероятность создания композиции модифицированных Т-клеток, которую можно вводить субъекту для клеточной терапии. В некоторых вариантах осуществления протоколы производства терапевтических композиций клеток могут требовать, чтобы композиции клеток были получены и выпущены для инфузии, например, проверены и/или определены в качестве подходящих для введения субъекту в течение некоторого периода времени. В некоторых аспектах можно ожидать, что малая длительность предложенного способа позволит уменьшить или устранить неэффективность процесса, которая может возникнуть из-за композиций клеток, которые не размножаются в течение требуемого периода времени.

[0059] В конкретных вариантах осуществления способы, предложенные в настоящем документе, применяются в отношении культивирования модифицированных клеток в условиях, которые способствуют пролиферации и/или размножению. В некоторых вариантах осуществления культивирование проводят в условиях, которые обеспечивают постоянное смешивание и/или перфузию культивируемых клеток,

например, в биореакторе или в сочетании с ним. В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере, часть культивирования проводят при постоянном перемешивании и медленной постоянной перфузии с заменой использованной среды свежей средой. В некоторых вариантах осуществления клетки первоначально культивируют в статических условиях, например, без перфузии или перемешивания, а затем культивируют с постоянным перемешиванием и перфузией, когда культивируемые клетки достигают заданного количества или плотности клеток, и/или после того, как клетки первоначально культивировали в течение некоторого времени. В некоторых таких вариантах осуществления культивируемые клетки достигают целевого или порогового количества, плотности и/или экспансии клеток быстрее, чем клетки, которые культивируют в альтернативных процессах. Таким образом, в некоторых вариантах культивирование с постоянным перемешиванием и/или перфузией позволяет завершить процесс создания или получения модифицированных клеток в течение более короткого периода времени, чем альтернативные процессы, в которых клетки культивируют в статических условиях.

[0060] В конкретных вариантах осуществления предложенные способы применяются в отношении процесса эффективного получения или создания модифицированных клеток, которые подходят для применения в клеточной терапии. В некоторых вариантах осуществления время, условия и реагенты, используемые в каждом этапе процесса, повышают эффективность каждого последующего этапа и/или всего процесса. Например, в некоторых вариантах осуществления клетки можно инкубировать с реагентом, например стимулирующим реагентом или вспомогательным веществом для трансдукции, в концентрациях, которые являются достаточно высокими для достижения требуемого эффекта, например, стимуляции клеток или повышения эффективности трансдукции, но при концентрации, которые являются достаточно низкими, чтобы избежать замедления роста или снижения выживаемости на последующих этапах обработки. Кроме того, в некоторых вариантах осуществления этапы процесса запланированы на начало или окончание в определенные моменты времени, чтобы повысить эффективность последующих этапов процесса и/или всего процесса. Например, в некоторых вариантах осуществления этапы инкубирования и конструирования (например, трансдукции или трансфекции клеток) завершаются в процессе раньше, чем в альтернативных способах, что в некоторых вариантах осуществления улучшает выживание и/или состояние, и/или скорость пролиферации и размножения клеток во время последующей стадии культивирования. Таким образом, в одном аспекте конкретные временные показатели, условия и реагенты каждого этапа влияют на клетки за пределами отдельного этапа и, в некоторых вариантах осуществления, влияют на эффективность всего процесса.

[0061] В некоторых вариантах осуществления способы применяются в отношении процесса, позволяющего создавать или получать генетически модифицированные клетки, подходящие для клеточной терапии таким образом, который может быть более быстрым и более эффективным, чем альтернативные процессы. В некоторых вариантах

осуществления способы, предложенные в настоящем документе, имеют высокий показатель положительных результатов при создании или получении композиций модифицированных клеток от более широкой совокупности субъектов, чем показатели, которые могут быть возможными в альтернативных процессах. В некоторых вариантах осуществления модифицированные клетки, полученные или созданные предложенными способами, могут иметь более высокое качество, жизнеспособность, активацию и могут иметь более высокую экспрессию рекомбинантного рецептора, чем клетки, полученные альтернативными способами. Таким образом, в некоторых аспектах скорость и эффективность предложенных способов создания модифицированных клеток для клеточной терапии обеспечивают более легкое планирование и координацию лечения клеточной терапией, такой как аутологичная терапия, в более широкой совокупности субъектов, чем может быть возможным в некоторых альтернативных способах.

[0062] Если не определено иное, все термины из уровня техники, примечания и другие технические и научные термины или терминология, используемая в настоящем документе, должны иметь такое же значение, какое обычно известно среднему специалисту в данной области техники, к которой относится заявленное изобретение. В некоторых случаях термины с обычно известными значениями определены в настоящем документе для ясности и/или для удобства ссылки, причем не следует обязательно считать, что включение таких определений в настоящий документ представляет существенные различия с тем, что обычно известно в уровне техники.

[0063] Все публикации, включая патентные документы, научные статьи и базы данных, указанные в настоящей заявке, включены посредством отсылки во всей своей полноте во всех отношениях, в той же степени, как если бы каждая отдельная публикация была отдельно включена посредством отсылки. Если определение, приведенное в настоящем документе, противоречит или иным образом не соответствует определению, изложенному в патентах, заявках, опубликованных заявках и других публикациях, которые включены в настоящий документ посредством отсылки, определение, изложенное в настоящем документе, имеет преимущественную силу над определением, которое включено в настоящий документ посредством отсылки.

[0064] Заголовки разделов, используемые в настоящем документе, служат исключительно в организационных целях и не должны рассматриваться как ограничение описанного изобретения.

## I. СПОСОБ СОЗДАНИЯ МОДИФИЦИРОВАННЫХ КЛЕТОК

[0065] В настоящем документе предложены способы создания готовой композиции модифицированных клеток, таких как модифицированные CD4<sup>+</sup> Т-клетки и/или модифицированные CD8<sup>+</sup> Т-клетки, которые экспрессируют рекомбинантный белок, например, рекомбинантный рецептор, такой как Т-клеточный рецептор (TCR) или химерный антигенный рецептор (CAR). В некоторых вариантах осуществления способы, предложенные в настоящем документе, применяются в отношении производства, создания или получения клеточной терапии и могут применяться в сочетании с

дополнительными этапами обработки, такими как этапы выделения, разделения, отбора, активации или стимуляции, трансдукции, промывки, суспендирования, разбавления, концентрирования и/или изготовления композиций клеток. В некоторых вариантах осуществления способы создания или получения модифицированных клеток, например, модифицированных CD4+ Т-клеток и/или модифицированных CD8+ Т-клеток, включают одно или более из выделения клеток у субъекта, подготовки, обработки, инкубирования при стимулирующих условиях и/или модификации (например, трансдукции) клеток. В некоторых вариантах осуществления способ включает этапы обработки, проводимые в порядке, в котором: исходные клетки, например первичные клетки, сначала выделяют, например, отбирают или отделяют, из биологического образца; исходные клетки инкубируют в стимулирующих условиях, модифицируют векторными частицами, например, вирусными векторными частицами, для введения рекомбинантного полинуклеотида в клетки, например, путем трансдукции или трансфекции; культивируют модифицированные клетки, например, трансдуцированные клетки, например, для размножения клеток; и собирают, получают и/или заполняют контейнер всеми или частью клеток для включения клеток в готовую композицию. В некоторых вариантах осуществления клетки полученной готовой композиции повторно вводят тому же субъекту, до или после криоконсервации. В некоторых вариантах осуществления готовые композиции модифицированных клеток подходят для применения в терапии, например, аутологичной клеточной терапии.

[0066] В конкретных вариантах осуществления предложенные способы применяют в отношении создания готовых композиций клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор, из начальной или исходной композиции клеток. В некоторых вариантах осуществления композиция клеток является композицией обогащенных Т-клеток, обогащенных CD4+ Т-клеток и/или обогащенных CD8+ Т-клеток (далее в настоящем документе также называемой композициями обогащенных Т-клеток, композициями обогащенных CD4+ Т-клеток и композициями обогащенных CD8+ Т-клеток, соответственно). В некоторых вариантах осуществления предложенные способы применяются в отношении одного или более из следующего: активация или стимуляция композиции клеток, обогащенной Т-клетками; генетическая модификация композиции обогащенных Т-клеток, например, для введения полинуклеотида, кодирующего рекомбинантный белок, путем трансдукции или трансфекции; и/или культивирование модифицированной композиции обогащенных Т-клеток, например, в условиях, которые вызывают пролиферацию и/или размножение. В некоторых вариантах осуществления способы также могут применяться в отношении выделения или отбора клеток из биологического образца, с получением исходной композиции обогащенных Т-клеток, например, из биологического образца, взятого, собранного и/или полученного у субъекта. В конкретных вариантах осуществления предложенные способы могут применяться в отношении сбора и/или изготовления композиций обогащенных Т-клеток после инкубирования, активации, стимуляции, модификации, трансдукции, трансфекции и/или

культивирования клеток.

[0067] В некоторых вариантах осуществления предложенные способы применяются в отношении выделения, разделения, отбора, активации или стимуляции, трансдукции, промывки, суспендирования, разбавления, концентрирования и/или изготовления одной композиции обогащенных Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления композиция обогащенных Т-клеток является композицией клеток, включающих обогащенные CD4+ Т-клетки. В некоторых вариантах осуществления композиция обогащенных CD4+ Т-клеток содержит по меньшей мере 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% или 99,9% CD4+ Т-клеток. В конкретных вариантах осуществления композиция обогащенных CD4+ Т-клеток содержит 100% CD4+ Т-клеток или содержит приблизительно 100% CD4+ Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления композиция обогащенных Т-клеток включает или содержит меньше 20%, меньше 10%, меньше 5%, меньше 1%, меньше 0,1% или меньше 0,01% CD8+ Т-клеток и/или не содержит CD8+ Т-клеток, и/или не содержит или по существу не содержит CD8+ Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления популяция клеток состоит по существу из CD4+ Т-клеток.

[0068] В некоторых вариантах осуществления предложенные способы применяются в отношении создания двух или более отдельных готовых композиций обогащенных Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления предложенные способы отдельно проводят в отношении двух или более отдельных композиций обогащенных Т-клеток, например, одной или более отдельных композиций обогащенных CD4+ Т-клеток и одной или более отдельных композиций обогащенных CD8+ Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления способы могут применяться в отношении отдельной активации и/или стимуляции двух или более композиций обогащенных Т-клеток; отдельной модификации двух или более композиций обогащенных Т-клеток; и/или отдельного культивирования двух или более композиций обогащенных Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления способы также могут применяться в отношении выделения или отбора различных клеток из биологического образца с получением отдельной исходной композиции обогащенных Т-клеток, таких как отдельные композиции обогащенных CD4+ Т-клеток и обогащенных CD8+ Т-клеток. В конкретных вариантах осуществления предложенные способы могут применяться в отношении отдельного сбора и/или изготовления отдельных композиций обогащенных Т-клеток после инкубирования, активации, стимуляции, модификации, трансдукции, трансфекции и/или культивирования Т-клеток.

[0069] В некоторых вариантах осуществления способы могут применяться в отношении отдельного инкубирования по меньшей мере одной отдельной композиции обогащенных CD4+ Т-клеток и по меньшей мере одной отдельной композиции обогащенных CD8+ Т-клеток; отдельной активации и/или стимуляции по меньшей мере одной отдельной композиции обогащенных CD4+ Т-клеток и по меньшей мере одной отдельной композиции обогащенных CD8+ Т-клеток после инкубирования; отдельной

модификации, трансдукции и/или трансфекции по меньшей мере одной отдельной композиции обогащенных CD4+ Т-клеток и по меньшей мере одной отдельной композиции обогащенных CD8+ Т-клеток после активации и/или стимуляции; отдельного культивирования по меньшей мере одной отдельной композиции обогащенных CD4+ Т-клеток и по меньшей мере одной отдельной композиции обогащенных CD8+ Т-клеток после модификации, трансдукции и/или трансфекции; отдельного получения и/или сбора по меньшей мере одной отдельной композиции обогащенных CD4+ Т-клеток и по меньшей мере одной отдельной композиции обогащенных CD8+ Т-клеток после культивирования; отдельного включения по меньшей мере одной отдельной композиции обогащенных CD4+ Т-клеток и по меньшей мере одной отдельной композиции обогащенных CD8+ Т-клеток после получения и/или сбора в состав; и/или отдельного введения композиций в готовом составе нуждающемуся в этом субъекту.

[0070] В некоторых вариантах осуществления две или более отдельных композиции обогащенных Т-клеток включают композицию обогащенных CD4+ Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления две или более отдельных композиции включают CD8+ Т-клетки. В некоторых вариантах осуществления две или более отдельных композиции включают композицию обогащенных CD4+ Т-клеток и композицию обогащенных CD8+ Т-клеток. В конкретных вариантах осуществления отдельная композиция обогащенных CD4+ Т-клеток и отдельная композиция обогащенных CD8+ Т-клеток происходят, например, были первоначально выделены, отобраны и/или обогащены, из одного и того же биологического образца, такого как один и тот же биологический образец, полученный, собранный и/или забранный у одного субъекта. В некоторых вариантах осуществления один и тот же биологический образец сначала подвергают отбору CD4+ Т-клеток, причем сохраняют как отрицательные, так и положительные фракции, а затем отрицательную фракцию подвергают отбору CD8+ Т-клеток. В других вариантах осуществления один и тот же биологический образец сначала подвергают отбору CD8+ Т-клеток, причем сохраняют как отрицательные, так и положительные фракции, а затем отрицательную фракцию подвергают отбору CD4+ Т-клеток.

[0071] В некоторых вариантах осуществления композиция обогащенных Т-клеток является композицией обогащенных CD8+ Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления композиция обогащенных CD8+ Т-клеток содержит по меньшей мере 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% или 99,9% CD8+ Т-клеток, или содержат 100% или приблизительно 100% CD8+ Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления композиции обогащенных CD8+ Т-клеток включают или содержат меньше 20%, меньше 10%, меньше 5%, меньше 1%, меньше 0,1% или меньше 0,01% CD4+ Т-клеток, и/или не содержат CD4+ Т-клеток, и/или не содержат или по существу не содержат CD4+ Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления популяция клеток состоит по существу из CD8+ Т-клеток.

[0072] В некоторых вариантах осуществления композицию обогащенных CD4+ Т-

клеток и/или модифицированную композицию обогащенных CD4+ Т-клеток инкубируют, активируют, стимулируют, модифицируют, трансдуцируют, трансфицируют и/или культивируют с и/или в присутствии рекомбинантного ИЛ-2. В конкретных вариантах осуществления способы применяются в отношении инкубирования исходной композиции обогащенных CD4+ Т-клеток в стимулирующих условиях с и/или в присутствии рекомбинантного ИЛ-2. В некоторых вариантах осуществления способы применяются в отношении культивирования модифицированной композиции обогащенных CD4+ Т-клеток в условиях, которые вызывают пролиферацию и/или размножение, с и/или в присутствии рекомбинантного ИЛ-2.

[0073] В некоторых вариантах осуществления инкубирование исходной пролиферацию обогащенных Т-клеток в стимулирующих условиях представляет собой или включает инкубирование клеток со стимулирующим реагентом, например, стимулирующим реагентом, описанным в Разделе I-B-1. В некоторых вариантах осуществления стимулирующий реагент удаляют или отделяют от клеток до этапа культивирования. В некоторых вариантах осуществления стимулирующий реагент удаляют или отделяют от клеток после генетической модификации, например, трансфекции или трансдукции. В некоторых вариантах осуществления стимулирующий реагент удаляют из клеток в течение установленного времени после начала или инициирования инкубирования со стимулирующим реагентом, например, в течение 7 или меньше дней после начала или инициирования инкубирования. В конкретных вариантах осуществления инкубирование в стимулирующих условиях проводят в присутствии одного или более антиоксидантов, например, серосодержащего антиоксиданта и/или предшественника глутатиона.

[0074] В конкретных вариантах осуществления композиции обогащенных Т-клеток, например, стимулированные композиции обогащенных Т-клеток, модифицируют в присутствии поликатиона, например, для повышения эффективности трансфекции или трансдукции. В некоторых вариантах осуществления поликатион присутствует в низком и/или относительно низком количестве и/или концентрации.

[0075] В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере, часть этапа культивирования проводят с постоянным перемешиванием и/или перфузией, например, с помощью биореактора в закрытой системе. В некоторых вариантах осуществления перемешивание и/или перфузия включает постоянную и/или постепенную замену используемых или старых клеточных сред или раствора свежими средами или раствором. В конкретных вариантах осуществления клетки культивируют в присутствии поверхностно-активного вещества и/или вещества, уменьшающего или предотвращающего сдвиговое разрушение клеток, такое как сдвиговое разрушение при постоянном перемешивании и/или перфузии.

[0076] В некоторых вариантах осуществления предложенные способы проводят таким образом, что один, больше одного или все этапы при получении клеток для клинического применения, например, в адоптивной клеточной терапии, проводят вне



контакта клеток с нестерильными условиями. В некоторых вариантах осуществления такого способа клетки выделяют, отделяют или отбирают, трансдуцируют, промывают, необязательно активируют или стимулируют и включают в состав, все в закрытой системе. В некоторых вариантах осуществления один или более этапов проводят вне закрытой системы или устройства. В некоторых таких вариантах осуществления композиции обогащенных клеток переносят вне закрытой системы или устройства в стерильных условиях, например, путем стерильного переноса в отдельную закрытую систему.

[0077] В конкретных вариантах осуществления композиции обогащенных Т-клеток могут быть собраны, включены в состав для криопротекции, подвергнуты криозаморозке и/или хранению при температуре ниже 0°C, ниже -20°C или -70°C или ниже -70C или -80°C, до, во время или после любой стадии или этапа процесса создания готовых композиций обогащенных Т-клеток, экспрессирующих рекомбинантные рецепторы. В некоторых вариантах осуществления клетки могут хранить до 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, или 10 дней или до 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 недель, или в течение по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8 недель, или больше 8 недель. После хранения композиции обогащенных Т-клеток могут размораживать и могут возобновлять обработку с той же точки в процессе. В некоторых вариантах осуществления исходные композиции обогащенных Т-клеток подвергают криозаморозке и хранят до последующей обработки, например, инкубирования при стимулирующих условиях. В конкретных вариантах осуществления культивированные и/или включенные в состав композиции обогащенных Т-клеток подвергают криозаморозке и хранят до введения субъекту, например, в качестве аутологичной клеточной терапии.

[0078] В некоторых вариантах осуществления отдельные композиции обогащенных Т-клеток объединяют в одну композицию. Например, в некоторых вариантах осуществления композицию обогащенных CD4+ Т-клеток объединяют с композицией обогащенных CD8+ Т-клеток в одну композицию обогащенных CD4+ и CD8+ Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления отдельные композиции происходят, например, были первоначально выделены, отобраны и/или обогащены, из одного и того же биологического образца, такого как один и тот же биологический образец, полученный, собранный и/или забранный у одного субъекта. В некоторых вариантах осуществления отдельные композиции обрабатывают отдельно в одном или более этапах или стадиях процесса создания готовых композиций, например, процесса в соответствии с предложенными способами. В некоторых вариантах осуществления отдельные композиции могут быть объединены в одну композицию до, во время или после любого этапа или стадии процесса создания готовых композиций. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления отдельные исходные, стимулированные, модифицированные, культивированные, включенные в состав и/или собранные композиции обогащенных Т-клеток из одного и того же биологического образца объединяют в одну композицию и, в некоторых вариантах осуществления, обрабатывают далее как одну композицию. В

некоторых вариантах осуществления отдельные готовые композиции обогащенных клеток объединяют в одну готовую композицию перед введением клеток субъекту.

[0079] В некоторых вариантах осуществления, на любой стадии или этапе в процессе, часть клеток может быть отобрана или собрана, например, клетки могут быть взяты из композиции обогащенных Т-клеток, тогда как композиция остается в закрытой системе, например, во время выделения, инкубирования, модификации, культивирования и/или включения в состав. В некоторых вариантах осуществления такие клетки могут исследовать на присутствие маркеров, признаков или свойств, включающих, без ограничения, жизнеспособность, апоптоз, активацию, стимуляцию, рост и/или истощение. В некоторых вариантах осуществления клетки отбирают или собирают с помощью автоматизированного процесса, при этом композиция обогащенных Т-клеток остается в закрытой системе. В некоторых вариантах осуществления анализ отобранных или собранных клеток является автоматизированным. В конкретных вариантах осуществления анализ проводят в закрытой системе в стерильных условиях.

[0080] В некоторых вариантах осуществления клетки или композиции клеток, которые получены и/или обработаны с применением предложенных способов, могут сравнивать с клетками или композициями клеток, обработанными или полученными в примерном и/или альтернативном процессе. В некоторых вариантах осуществления альтернативный и/или примерный процесс может отличаться одним или более определенными аспектами, но в остальном содержит подобные или такие же признаки, аспекты, этапы, стадии, реагенты и/или условия варианта осуществления или аспекта предложенных способов, которые сравнивают. Например, когда предложенные способы применяют в отношении инкубирования клеток в присутствии реагента, такие клетки могут сравнивать с клетками, которые не инкубируют с реагентом в примерном и/или альтернативном процессе. В некоторых вариантах осуществления, если не определено иное, предложенные способы и примерный и/или альтернативный процесс были бы в остальном подобными и/или идентичными, например, с подобными или идентичными этапами для выделения, отбора, обогащения, активации, стимуляции, модификации, трансфекции, трансдукции, культивирования и/или включения в состав. В некоторых вариантах осуществления, если не определено иное, предложенные способы и альтернативный процесс включают выделение, отбор и/или обогащение клеток из одних и тех же или подобных типов биологических образцов, и/или обработку клеток и/или исходных клеток одного и того же типа.

[0081] Также предложены клетки и композиции, полученные настоящими способами, в том числе фармацевтические композиции и составы, а также наборы, системы и устройства для осуществления способов. Также предложены способы применения клеток и композиций, полученных настоящими способами, в том числе терапевтические способы, такие как способы адоптивной клеточной терапии, а также фармацевтические композиции для введения субъектам.

#### **А. Образцы и препараты клеток**

[0082] В конкретных вариантах осуществления предложенные способы применяют в отношении выделения, отбора и/или обогащения клеток из биологического образца с получением одной или более исходных композиций обогащенных клеток, например Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления предложенные способы включают выделение клеток или их композиций из биологических образцов, таких как образцы, полученные или происходящие от субъекта, такого как субъект, имеющий конкретное заболевание или состояние или нуждающийся в клеточной терапии, или которому будут вводить клеточную терапию. В некоторых аспектах субъектом является человек, такой как субъект, который является пациентом, нуждающимся в конкретном терапевтическом вмешательстве, таком как адоптивная клеточная терапия, для которой клетки выделяют, обрабатывают и/или модифицируют. Таким образом, клетки в некоторых вариантах осуществления являются первичными клетками, например, первичными клетками человека. Образцы включают ткань, жидкость и другие образцы, забранные непосредственно у субъекта. Биологический образец может быть образцом, полученным непосредственно из обрабатываемого биологического источника или образца. Биологические образцы включают, без ограничения перечисленными, физиологические жидкости, такие как кровь, плазму, сыворотку, спинномозговую жидкость, синовиальную жидкость, мочу и пот, образцы тканей и органов, включая обработанные образцы, полученные из них.

[0083] В некоторых аспектах образец является кровью или полученным из крови образцом, или представляет собой или получен из продукта афереза или лейкофереза. Примеры образцов включают цельную кровь, мононуклеарные клетки периферической крови (МКПК), лейкоциты, костный мозг, тимус, тканевую биопсию, опухоль, лейкоз, лимфому, лимфатический узел, кишечно-ассоциированную лимфоидную ткань, лимфоидную ткань слизистой оболочки, селезенку, другие лимфоидные ткани, печень, легкие, желудок, кишечник, толстую кишку, почки, поджелудочную железу, молочную железу, кость, предстательную железу, шейку матки, яички, яичники, миндалины или другой орган, и/или клетки, полученные из них. Образцы включают, в контексте клеточной терапии, например, адоптивную клеточную терапию, образцы из аутологических и аллогенных источников.

[0084] В некоторых примерах клетки из циркулирующей крови субъекта получают, например, путем афереза или лейкофереза. Образцы в некоторых аспектах содержат лимфоциты, в том числе Т-клетки, моноциты, гранулоциты, В-клетки, другие ядросодержащие лейкоциты, эритроциты и/или тромбоциты, и, в некоторых аспектах, содержат другие клетки, отличные от эритроцитов и тромбоцитов.

[0085] В некоторых вариантах осуществления клетки крови, забранные у субъекта, промывают, например, для удаления плазменной фракции и помещения клеток в подходящий буфер или среды для последующих этапов обработки. В некоторых вариантах осуществления клетки промывают фосфатно-солевым буфером (PBS). В некоторых вариантах осуществления раствор для промывки не содержит кальция и/или

магния, и/или многих или никаких двухвалентных катионов. В некоторых аспектах этап промывки выполняют при использовании полуавтоматической "проточной" центрифуги (например, клеточного процессора Cobe 2991, Baxter) согласно инструкциям производителя. В некоторых аспектах этап промывки выполняют путем фильтрации в тангенциальном потоке (TFF) согласно инструкциям производителя. В некоторых вариантах осуществления клетки ресуспендируют в различных биосовместимых буферах после промывки, такой как, например, не содержащим  $\text{Ca}^{++}/\text{Mg}^{++}$  PBS. В некоторых вариантах осуществления компоненты образца клеток крови удаляют, и клетки непосредственно ресуспендируют в культуральных средах.

[0086] В некоторых вариантах осуществления способы получения включают этапы замораживания, например криоконсервации, клеток, до или после выделения, отбора и/или обогащения, и/или инкубирования для трансдукции и модификации, и/или после культивирования и/или сбора модифицированных клеток. В некоторых вариантах осуществления при замораживании и последующем этапе размораживания удаляют гранулоциты и, в некоторой степени, моноциты в популяции клеток. В некоторых вариантах осуществления клетки суспендируют в растворе для замораживания, например, после этапа промывки, для удаления плазмы и тромбоцитов. В некоторых аспектах может использоваться любой из различных известных растворов для замораживания и параметров. В некоторых вариантах осуществления клетки замораживают, например, подвергают криозаморозке или криоконсервации, в средах и/или растворе с конечной концентрацией ДМСО, равной или приблизительно равной 12,5%, 12,0%, 11,5%, 11,0%, 10,5%, 10,0%, 9,5%, 9,0%, 8,5%, 8,0%, 7,5%, 7,0%, 6,5%, 6,0%, 5,5% или 5,0%, или от 1% до 15%, от 6% до 12%, от 5% до 10% или от 6% до 8% ДМСО. В конкретных вариантах осуществления клетки замораживают, например, подвергают криозаморозке или криоконсервации, в средах и/или растворе с конечной концентрацией ЧСА, равной или приблизительно равной 5,0%, 4,5%, 4,0%, 3,5%, 3,0%, 2,5%, 2,0%, 1,5%, 1,25%, 1,0%, 0,75%, 0,5% или 0,25%, или от 0,1% до 5%, от 0,25% до 4%, от 0,5% до 2% или от 1% до 2% ЧСА. Один пример включает использование PBS, содержащего 20% ДМСО и 8% человеческого сывороточного альбумина (ЧСА), или других подходящих сред для замораживания клеток. Затем раствор разбавляют 1:1 средой, чтобы конечная концентрация ДМСО и ЧСА составляла 10% и 4%, соответственно. После этого клетки обычно замораживают при температуре  $-80^{\circ}\text{C}$  или приблизительно  $-80^{\circ}\text{C}$  со скоростью  $1^{\circ}$  или приблизительно  $1^{\circ}$  в минуту и хранят в паровой фазе в емкости для хранения в жидком азоте.

[0087] В некоторых вариантах осуществления выделение клеток или популяций включает один или более этапов получения и/или неаффинного разделения клеток. В некоторых примерах клетки промывают, центрифугируют и/или инкубируют в присутствии одного или более реагентов, например, для удаления нежелательных компонентов, обогащения требуемыми компонентами, лизиса или удаления клеток, чувствительных к конкретным реагентам. В некоторых примерах клетки разделяют на

основе одного или более свойств, таких как плотность, адгезивные свойства, размер, чувствительность и/или устойчивость к конкретным компонентам. В некоторых вариантах осуществления способы включают способы разделения клеток по плотности, такие как получение лейкоцитов из периферической крови путем лизиса эритроцитов и центрифугирования в градиенте плотности перколл или фиколла.

[0088] В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере часть этапа отбора включает инкубирование клеток с реагентом для отбора. Инкубирование с реагентом или реагентами для отбора, например, как часть методов отбора, которые могут быть выполнены при использовании одного или более реагентов для отбора с целью отбора клеток одного или более разных типов по экспрессии или присутствию в или на клетке одной или более специфических молекул, таких как поверхностные маркеры, например, поверхностные белки, внутриклеточные маркеры или нуклеиновая кислота. В некоторых вариантах осуществления любой известный метод может использоваться при использовании реагента или реагентов для отбора с целью разделения на основе таких маркеров. В некоторых вариантах осуществления реагент или реагенты для отбора приводят к разделению, которое является аффинным или иммуноаффинным разделением. Например, отбор в некоторых аспектах включает инкубирование с реагентом или реагентами для разделения клеток и популяций клеток по экспрессии клеток или уровня экспрессии одного или более маркеров, как правило, маркеров клеточной поверхности, например, при инкубировании с антителом или партнером по связыванию, которые специфично связываются с такими маркерами, обычно с путем этапов промывки и отделения клеток, связавшихся с антителом или партнером по связыванию, от тех клеток, которые не связались с антителом или партнером по связыванию.

[0089] В некоторых аспектах таких процессов объем клеток смешивают с количеством требуемого реагента для аффинного отбора. Иммуноаффинный отбор могут проводить при помощи любой системы или способа, которые приводят к благоприятному энергетическому взаимодействию между разделяемыми клетками и молекулой, специфично связывающейся с маркером на клетке, например, антителом или другим партнером по связыванию, на твердой поверхности, например, частице. В некоторых вариантах осуществления способы проводят при использовании частиц, таких как сферы, например, магнитные сферы, которые покрыты средством для отбора (например, антителом), специфичным к маркеру клеток. Частицы (например, сферы) могут инкубировать или смешивать с клетками в контейнере, таком как пробирка или мешок, при встряхивании или перемешивании, при постоянном отношении плотности клеток к частице (например, сфере), чтобы способствовать возникновению энергетически выгодных взаимодействий. В других случаях способы включают отбор клеток, в которых весь отбор или часть отбора проводят во внутренней полости центрифужной камеры, например, при вращении ротора центрифуги. В некоторых вариантах осуществления инкубирование клеток с реагентами для отбора, такими как реагенты для иммуноаффинного отбора, проводят в центрифужной камере. В некоторых вариантах

осуществления выделение или разделение производят при использовании системы или устройства, описанного в публикации Международной заявки на патент WO2009/072003 или US 20110003380 A1. В одном примере система представляет собой систему, описанную в Международной публикации WO2016/073602.

[0090] В некоторых вариантах осуществления, при проведении таких этапов отбора или их частей (например, инкубирования с покрытыми антителами частицами, например, магнитными сферами) в полости центрифужной камеры, пользователь может контролировать некоторые параметры, такие как объем различных растворов, добавление раствора во время обработки и подбор их времени, что может обеспечить преимущества по сравнению с другими доступными способами. Например, возможность уменьшить объем жидкости в полости в ходе инкубирования может увеличивать концентрацию частиц (например, реагента в виде сфер), используемых при отборе, и, таким образом, повысить химический потенциал раствора, не влияя на общее количество клеток в полости. Это, в свою очередь, может улучшить парные взаимодействия между обрабатываемыми ячейками и частицами, используемыми для отбора. В некоторых вариантах осуществления проведение этапа инкубирования в камере, например, когда он связан с системами, схемами и контролем, как описано в настоящем документе, позволяет пользователю осуществлять перемешивание раствора в нужный момент(ы) во время инкубирования, что также может улучшить взаимодействие.

[0091] В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере часть этапа отбора проводят в центрифужной камере, что включает инкубирование клеток с реагентом для отбора. В некоторых аспектах таких процессов объем клеток смешивают с количеством требуемого реагента для аффинного отбора, которое намного меньше, чем обычно используемое при выполнении подобных отборов, в пробирке или контейнере, для отбора такого же количества клеток и/или объема клеток, согласно инструкциям производителя. В некоторых вариантах осуществления используется количество реагента или реагентов для отбора, которое составляет не больше 5%, не больше 10%, не больше 15%, не больше 20%, не больше 25%, не больше 50%, не больше 60%, не больше 70% или не больше 80% количества такого же реагента(ов) для отбора, используемого для отбора, при инкубировании в пробирке или контейнере, такого же количества клеток и/или такого же объема клеток согласно инструкциям производителя.

[0092] В некоторых вариантах осуществления для отбора, например, иммуноаффинного отбора клеток, клетки инкубируют в полости камеры в композиции, также содержащей буфер для отбора, с реагентом для отбора, таким как молекула, которая специфично связывается с поверхностным маркером на клетке, которую нужно обогатить и/или истощить, но не на других клетках в композиции, такая как антитело, которое необязательно связано с каркасом, таким как полимер, или поверхностью, например, сферой, например, магнитной сферой, такой как магнитные сферы, связанные с моноклональными антителами, специфичными к CD4 и CD8. В некоторых вариантах осуществления, как описано, реагент для отбора добавляют к клеткам в полости камеры в

количестве, которое существенно меньше (например, составляет не больше 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70% или 80% от количества) по сравнению с количеством реагента для отбора, который, как правило, используется или будет необходим для достижения примерной такой же или подобной эффективности отбора такого же количества клеток или такого же объема клеток, когда отбор производят в пробирке с встряхиванием или вращением. В некоторых вариантах осуществления инкубирование производят с добавлением буфера для отбора к клеткам и реагенту для отбора с получением целевого объема с инкубированием реагента, например, от 10 мл до 200 мл, например, по меньшей мере или по меньшей мере приблизительно или приблизительно 10 мл, 20 мл, 30 мл, 40 мл, 50 мл, 60 мл, 70 мл, 80 мл, 90 мл, 100 мл, 150 мл или 200 мл. В некоторых вариантах осуществления буфер для отбора и реагент для отбора предварительно смешивают перед добавлением к клеткам. В некоторых вариантах осуществления буфер для отбора и реагент для отбора отдельно добавляют к клеткам. В некоторых вариантах осуществления инкубирование при отборе проводят в условиях периодического мягкого перемешивания, которое может способствовать возникновению энергетически выгодных взаимодействий и, таким образом, позволит использовать в целом меньше реагента для отбора с сохранением высокой эффективности отбора.

[0093] В некоторых вариантах осуществления общая продолжительность инкубирования с реагентом для отбора составляет от 5 минут до 6 часов или от приблизительно 5 минут до приблизительно 6 часов, например, от 30 минут до 3 часов, например, по меньшей мере или по меньшей мере приблизительно 30 минут, 60 минут, 120 минут или 180 минут.

[0094] В некоторых вариантах осуществления инкубирование обычно проводят в условиях смешивания, например, в присутствии вращения, обычно при относительно низкой силе или скорости, такой как скорость ниже, чем используемая для осаждения клеток, такая как от 600 об/мин до 1700 об/мин или от приблизительно 600 об/мин до приблизительно 1700 об/мин (например, составляющая или составляющая приблизительно или по меньшей мере 600 об/мин, 1000 об/мин или 1500 об/мин, или 1700 об/мин), такой как при RCF в образце или на стенке камеры или другом контейнере от 80 g до 100 g или от приблизительно 80 g до приблизительно 100 g (например, составляющей или составляющей приблизительно или по меньшей мере 80 g, 85 g, 90 g, 95 g или 100 g). В некоторых вариантах осуществления вращение проводят с использованием повторных интервалов вращения при такой низкой скорости с последующим периодом выдерживания, например, при вращении и/или выдерживании в течение 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 секунд, таких как вращение приблизительно 1 или 2 секунды с последующим перерывом в течение приблизительно 5, 6, 7 или 8 секунд.

[0095] В некоторых вариантах осуществления такой процесс проводят в полностью закрытой системе, с которой камера представляет единое целое. В некоторых вариантах осуществления этот процесс (и в некоторых аспектах также один или более дополнительных этапов, таких как предыдущий этап промывки, в котором промывают

содержащий клетки образец, такой как образец афереза) проводят в автоматическом режиме, при этом клетки, реагент и другие компоненты подают камеру и выпускают из камеры в подходящее время, и проводят центрифугирование с завершением этапа промывки и связывания в одной закрытой системе с использованием автоматизированной программы.

[0096] В некоторых вариантах осуществления, после инкубирования и/или смешивания клеток и реагента и/или реагентов для отбора, инкубируемые клетки подвергают разделению для отбора клеток по присутствию или отсутствию конкретного реагента или реагентов. В некоторых вариантах осуществления разделение проводят в одной и той же закрытой системе, в которой проводили инкубирование клеток с реагентом для отбора. В некоторых вариантах осуществления, после инкубирования с реагентами для отбора, инкубируемые клетки, включая клетки, в которых связался реагент для отбора, переносят в систему для иммуноаффинного разделения клеток. В некоторых вариантах осуществления система для иммуноаффинного разделения представляет собой или содержит магнитную разделительную колонку.

[0097] Такие этапы разделения могут быть основаны на положительном отборе, в котором клетки, связывшиеся с реагентами, например, антителом или партнером по связыванию, сохраняют для последующего применения, и/или на отрицательном отборе, в котором сохраняют клетки, не связывавшиеся с реагентом, например, антителом или партнером по связыванию. В некоторых примерах обе фракции сохраняют для последующего применения. В некоторых аспектах отрицательный отбор может быть особенно полезным, если не доступно никакое антитело, который позволяет специфично идентифицировать тип клетки в гетерогенной популяции, при этом разделение лучше всего проводить на основе маркеров, экспрессируемых клетками, отличными от нужной популяции.

[0098] В некоторых вариантах осуществления этапы процесса дополнительно включают отрицательный и/или положительный отбор инкубируемых клеток, например, при использовании системы или устройства, которые позволяют производить отбор на основе аффинности. В некоторых вариантах осуществления выделение проводят посредством обогащения конкретной популяции клеток путем положительного отбора или истощения конкретной популяции клеток путем отрицательного отбора. В некоторых вариантах осуществления положительный или отрицательный отбор выполняют путем инкубирования клеток с одним или более антителами или другим связывающим средством, которое специфично связывается с одним или более поверхностными маркерами, экспрессируемыми или экспрессируемыми (маркер+) на относительно более высоком уровне (маркер<sup>высокий</sup>) на положительно или отрицательно отобранных клетках, соответственно. Могут выполнять множество повторов того же этапа отбора, например, этапа положительного или отрицательного отбора. В некоторых вариантах осуществления положительно или отрицательно отобранную фракцию подвергают процессу отбора, например, путем повтора этапа положительного или отрицательного отбора. В некоторых



вариантах осуществления отбор повторяют два раза, три раза, четыре раза, пять раз, шесть раз, семь раз, восемь раз, девять раз или больше девяти раз. В некоторых вариантах осуществления такой же отбор выполняют до пяти раз. В некоторых вариантах осуществления такой же этап отбора выполняют три раза.

[0099] Разделение не должно приводить к 100% обогащению или удалению конкретной клетки или популяции клеток, экспрессирующих конкретный маркер. Например, положительный отбор клеток или обогащение клетками конкретного типа, такими как клетки, которые экспрессируют маркер, относится к увеличению количества или процентного содержания таких клеток, но не должен приводить к полному отсутствию клеток, не экспрессирующих такой маркер. Аналогичным образом, отрицательный отбор, удаление или истощение клеток конкретного типа, таких как клетки, которые экспрессируют маркер, относится к уменьшению количества или процентного содержания таких клеток, но не должно приводить к полному удалению всех таких клеток.

[0100] В некоторых примерах выполняют множество повторов этапов разделения, где положительно или отрицательно отобранную фракцию из одного этапа подвергают другому этапу разделения, такому как последующий положительный или отрицательный отбор. В некоторых примерах один этап разделения может элиминировать клетки, экспрессирующие множество маркеров, одновременно, например, при инкубировании клеток с множеством антител или партнеров по связыванию, каждый из которых специфичен к маркеру, являющимся мишенью для отрицательного отбора. Аналогичным образом, множество типов клеток могут одновременно подвергаться положительному отбору при инкубировании клеток с множеством антител или партнеров по связыванию, экспрессируемых на клетках различных типов. В некоторых вариантах осуществления один или более этапов разделения повторяют и/или выполняют несколько раз. В некоторых вариантах осуществления положительно или отрицательно отобранную фракцию, полученную в результате этапа разделения, подвергают такому же этапу разделения, например, при повторе этапа положительного или отрицательного отбора. В некоторых вариантах осуществления один этап разделения повторяют и/или выполняют несколько раз, например, для увеличения выхода положительно отбираемых клеток, увеличения чистоты отрицательно отбираемых клеток и/или дополнительного удаления положительно отбираемых клеток из отрицательно отобранной фракции. В некоторых вариантах осуществления один или более этапов разделения выполняют и/или повторяют два раза, три раза, четыре раза, пять раз, шесть раз, семь раз, восемь раз, девять раз, десять раз или больше десяти раз. В некоторых вариантах осуществления один или более этапов отбора выполняют и/или повторяют от одного до десяти раз, от одного до пяти раз или от трех до пяти раз. В некоторых вариантах осуществления один или более этапов отбора повторяют три раза.

[0101] Например, в некоторых аспектах определенные субпопуляции Т-клеток, таких как клетки, положительные на или экспрессирующие высокий уровень одного или

более поверхностных маркеров, например, CD28+, CD62L+, CCR7+, CD27+, CD127+, CD4+, CD8+, CD45RA+ и/или CD45RO+ Т-клетки, выделяют с помощью методов положительного или отрицательного отбора. В некоторых вариантах осуществления такие клетки отбирают при инкубировании с одним или более антителами или партнером по связыванию, которые специфично связываются с такими маркерами. В некоторых вариантах осуществления антитело или партнер по связыванию могут быть конъюгированы, например, напрямую или непрямо, с твердой подложкой или матрицей для проведения отбора, такими как магнитная сфера или парамагнитная сфера. Например, CD3+, CD28+ Т-клетки могут быть положительно отобраны при использовании CD3/CD28-конъюгированных магнитных сфер (например, сфер DYNABEADS® M-450 CD3/CD28 T Cell Expander и/или ExpACT®).

[0102] В некоторых вариантах осуществления Т-клетки выделяют из образца МКПК при отрицательном отборе на маркеры, экспрессируемые на не-Т-клетках, таких как В-клетки, моноциты или другие лейкоциты, такие как CD14. В некоторых аспектах этап CD4+ или CD8+ отбора используют для отделения CD4+ хелперных и CD8+ цитотоксических Т-клеток. Такие CD4+ и CD8+ популяции затем могут быть подвергнуты сортировке на субпопуляции путем положительного или отрицательного отбора на маркеры, экспрессируемые или экспрессируемые в относительно более высокой степени в одной или более субпопуляциях наивных, память и/или эффекторных Т-клетках.

[0103] В некоторых вариантах осуществления CD8+ Т-клетки дополнительно обогащают или истощают по наивным стволовым клеткам, центральной памяти, эффекторной памяти и/или стволовым клеткам центральной памяти, например, путем положительного или отрицательного отбора по поверхностным антигенам, ассоциированным с соответствующей субпопуляцией. В некоторых вариантах осуществления обогащение Т-клетками центральной памяти (ТСМ) проводят для повышения эффективности, например, улучшения долговременной выживаемости, экспансии и/или приживания после введения, которые в некоторых аспектах являются особенно эффективными в таких субпопуляциях. См. Terakura et al., (2012) *Blood*.1:72-82; Wang et al. (2012) *J Immunother*. 35(9):689-701. В некоторых вариантах осуществления объединение ТСМ-обогащенных CD8+ Т-клеток и CD4+ Т-клеток дополнительно повышает эффективность.

[0104] В вариантах осуществления Т-клетки памяти присутствуют в CD62L+ и в CD62L- субпопуляциях CD8+ лимфоцитов периферической крови. МКПК могут быть обогащены или истощены CD62L-CD8+ и/или CD62L+CD8+ фракциями, например, при использовании антител против CD8 и против CD62L.

[0105] В некоторых вариантах осуществления обогащение Т-клетками центральной памяти (ТСМ) 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 экспрессирующих высокие уровни CD45RA и/или гранзима В. В некоторых аспектах выделение CD8+ популяции,

обогащенной TCM-клетками, выполняют путем элиминирования клеток, экспрессирующих CD4, CD14, CD45RA, и путем положительного отбора или обогащения клетками, экспрессирующими CD62L. В одном аспекте обогащение T-клетками центральной памяти (TCM) выполняют, начиная с отрицательной фракции клеток, отобранных по экспрессии CD4, которые подвергают отрицательному отбору по экспрессии CD14 и CD45RA, и положительному отбору по CD62L.

[0106] Такие отборы в некоторых аспектах выполняют одновременно, а в других аспектах выполняют последовательно, в любом порядке. В некоторых аспектах такой же этап отбора, основанный на экспрессии CD4, используемый при получении CD8+ популяции или субпопуляции T-клеток, также используют для получения популяции или субпопуляции CD4+ T-клеток, при этом положительные и отрицательные фракции после разделения по CD4 сохраняют и используют в последующих этапах способов, необязательно после одного или более дополнительных этапов положительного или отрицательного отбора. В некоторых вариантах осуществления отбор популяции CD4+ T-клеток и отбор популяции CD8+ T-клеток производят одновременно. В некоторых вариантах осуществления отбор популяции CD4+ T-клеток и популяции CD8+ T-клеток выполняют последовательно, в любом порядке. В некоторых вариантах осуществления способы отбора клеток могут включать способы, описанные в опубликованной заявке US20170037369. В некоторых вариантах осуществления отобранную популяцию CD4+ T-клеток и отобранную популяцию CD8+ T-клеток могут объединять после отбора. В некоторых аспектах отобранную популяцию CD4+ T-клеток и отобранную популяцию CD8+ T-клеток могут объединять в мешке биореактора, как описано в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления отобранную популяцию CD4+ T-клеток и отобранную популяцию CD8+ T-клеток обрабатывают отдельно, при этом отобранную популяцию CD4+ T-клеток обогащают CD4+ T-клетками и инкубируют со стимулирующим реагентом (например, магнитными сферами против CD3/CD28), трансдуцируют вирусным вектором, кодирующим рекомбинантный белок (например, CAR), и культивируют в условиях для размножения T-клеток, и отобранную популяцию CD8+ T-клеток обогащают CD8+ T-клетками и инкубируют со стимулирующим реагентом (например, магнитными сферами против CD3/CD28), трансдуцируют вирусным вектором, кодирующим рекомбинантный белок (например, CAR), таким как такой же рекомбинантный белок, как при модификации CD4+ T-клеток от того же донора, и культивируют в условиях для размножения T-клеток, например, в соответствии с предложенными способами.

[0107] В конкретных вариантах осуществления биологический образец, например, образец МКПК или других лейкоцитов, подвергают отбору CD4+ T-клеток, где сохраняют отрицательные и положительные фракции. В некоторых вариантах осуществления CD8+ T-клетки отбирают из отрицательной фракции. В некоторых вариантах осуществления биологический образец подвергают отбору CD8+ T-клеток, где сохраняют отрицательные и положительные фракции. В некоторых вариантах осуществления CD4+ T-клетки

отбирают из отрицательной фракции.

[0108] В конкретном примере образец МКПК или образец других лейкоцитов подвергают отбору CD4+ Т-клеток, где сохраняют отрицательные и положительные фракции. Затем отрицательную фракцию подвергают отрицательному отбору по экспрессии CD14 и CD45RA или CD19, и положительному отбору по маркерной характеристике Т-клеток центральной памяти, таких как CD62L или CCR7, где положительный и отрицательный отбор выполняют в любом порядке.

[0109] CD4+ Т-хелперные клетки могут сортировать с разделением наивных, центральной памяти и эффекторных клеток путем идентификации популяций клеток, имеющих антигены клеточной поверхности. CD4+ лимфоциты могут быть получены стандартными способами. В некоторых вариантах осуществления наивные CD4+ Т-лимфоциты являются CD45RO-, CD45RA+, CD62L+ или CD4+ Т-клетками. В некоторых вариантах осуществления CD4+ Т-клетки центральной памяти являются CD62L+ и CD45RO+. В некоторых вариантах осуществления эффекторные CD4+ Т-клетки являются CD62L- и CD45RO-.

[0110] В одном примере для обогащения CD4+ Т-клетками путем отрицательного отбора смесь моноклональных антител, как правило, включает антитела к CD14, CD20, CD11b, CD16, HLA-DR и CD8. В некоторых вариантах осуществления антитело или партнер по связыванию связаны с твердой подложкой или матрицей, такой как магнитная сфера или парамагнитная сфера, что позволяет выполнять разделение клеток путем положительного и/или отрицательного отбора. Например, в некоторых вариантах осуществления клетки и популяции клеток разделяют или выделяют при использовании иммуномагнитных (или магнитоаффинных) методов разделения (рассмотренных 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).

[0111] В некоторых аспектах инкубируемый образец или композиция клеток, подлежащие разделению, инкубируют с реагентом для отбора, содержащим мелкий, намагничиваемый или магниточувствительный материал, такой как магниточувствительные частицы или микрочастицы, такие как парамагнитные сферы (например, такие как сферы Dynabeads или MACS®). Магниточувствительный материал, например частица, обычно напрямую или непрямоу присоединен к партнеру по связыванию, например антителу, которое специфично связывается с молекулой, например поверхностным маркером, присутствующим на клетке, клетках или популяции клеток, которые нужно разделить, например, которые нужно подвергнуть отрицательному или положительному отбору.

[0112] В некоторых вариантах осуществления магнитная частица или сфера включает магниточувствительный материал, связанный с определенным участником пары связывания, таким как антитело или другой партнер по связыванию. Известно множество магниточувствительных материалов для применения в методах магнитного разделения,

например, описанные в патенте США 4,452,773 (Molday) и в описании европейской заявки EP 452342 B, которые настоящим включены посредством отсылки. Также могут использоваться частицы коллоидных размеров, такие как описанные в патенте США 4,795,698 (Owen) и патенте США 5,200,084 (Liberti et al.).

[0113] Инкубирование обычно проводят в условиях, при которых антитела или партнеры по связыванию, или такие молекулы, как вторичные антитела или другие реагенты, специфично связывающиеся с такими антителами или партнерами по связыванию, которые связаны с магнитной частицей или сферой, специфично связываются с молекулами клеточной поверхности в случае их присутствия на клетках в образце.

[0114] В некоторых вариантах осуществления магниточувствительные частицы покрывают первичными антителами или другими партнерами по связыванию, вторичными антителами, лектинами, ферментами или стрептавидином. В некоторых вариантах осуществления магнитные частицы прикрепляются к клеткам посредством покрытия из первичных антител, специфичных к одному или более маркерам. В некоторых вариантах осуществления клетки, а не сферы, метят первичным антителом или партнером по связыванию, а затем добавляют магнитные частицы, покрытые специфичным к конкретному типу клетки вторичным антителом или другим партнером по связыванию (например, стрептавидином). В некоторых вариантах осуществления покрытые стрептавидином магнитные частицы используются в сочетании с биотинилированными первичными или вторичными антителами.

[0115] В некоторых аспектах разделение достигается в процедуре, в которой образец помещают в магнитное поле, и клетки, к которым присоединены магниточувствительные или намагничиваемые частицы, будут притягиваться к магниту и отделяться от немеченых клеток. Для положительного отбора сохраняют клетки, которые притягиваются к магниту; для отрицательного отбора сохраняют клетки, которые не притягиваются (немеченые клетки). В некоторых аспектах комбинацию положительного и отрицательного отбора применяют во время одного этапа отбора, где положительные и отрицательные фракции сохраняют и затем обрабатывают или подвергают последующим этапам разделения.

[0116] В некоторых вариантах осуществления отбор на основе аффинности осуществляется посредством магнитно-активированной сортировки клеток (MACS) (Miltenyi Biotec, Auburn, CA). Магнитно-активированная сортировка клеток (MACS), например, с использованием систем CliniMACS, позволяет с высокой чистотой производить отбор клеток, к которым прикреплены намагниченные частицы. В некоторых вариантах осуществления MACS работает в режиме, в котором нецелевые и целевые единицы последовательно элюируются после приложения внешнего магнитного поля. Таким образом, клетки, прикрепленные к намагниченным частицам, удерживаются на месте, тогда как неприкрепленные единицы элюируются. Затем, после завершения этого первого этапа элюции, единицы, которые были задержаны в магнитном поле и не могли

элюироваться, высвобождаются некоторым образом, что они могут быть элюированы и собраны. В некоторых вариантах осуществления нецелевые клетки метят и удаляют из гетерогенной популяции клеток.

[0117] В некоторых вариантах осуществления магниточувствительные частицы остаются прикрепленными к клеткам, которые затем подлежат инкубированию, культивированию и/или модификации; в некоторых аспектах частицы остаются прикрепленными к клеткам для введения пациенту. В некоторых вариантах осуществления намагничиваемые или магниточувствительные частицы удаляют с клеток. Способы удаления намагничиваемых частиц с клеток известны и включают, например, применение конкурирующих немеченых антител, намагничиваемых частиц или антител, конъюгированных с расщепляемыми линкерами, и т.д. В некоторых вариантах осуществления намагничиваемые частицы являются биоразлагаемыми.

[0118] В некоторых вариантах осуществления выделение и/или отбор приводит к получению одной или более исходных композиций обогащенных Т-клеток, например, CD3+ Т-клеток, CD4+ Т-клеток и/или CD8+ Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления две или более отдельных исходных композиций выделяют, отбирают, обогащают или получают из одного биологического образца. В некоторых вариантах осуществления отдельные исходные композиции выделяют, отбирают, обогащают и/или получают из отдельных биологических образцов, собранных, забранных и/или полученных у одного субъекта.

[0119] В некоторых вариантах осуществления одна или более исходных композиций представляют собой или включают композицию обогащенных Т-клеток, которая включает по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99%, по меньшей мере 99,5%, по меньшей мере 99,9% или 100% или приблизительно 100% CD3+ Т-клеток. В конкретном варианте осуществления исходная композиция обогащенных Т-клеток состоит по существу из CD3+ Т-клеток.

[0120] В некоторых вариантах осуществления одна или более исходных композиций представляют собой или включают композицию обогащенных CD4+ Т-клеток, которая включает по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99%, по меньшей мере 99,5%, по меньшей мере 99,9% или 100% или приблизительно 100% CD4+ Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления исходная композиция CD4+ Т-клеток включает меньше 40%, меньше 35%, меньше 30%, меньше 25%, меньше 20%, меньше 15%, меньше 10%, меньше 5%, меньше 1%, меньше 0,1% или меньше 0,01% CD8+ Т-клеток, и/или не содержит CD8+ Т-клеток, и/или не содержит или по существу не содержит CD8+ Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления композиция обогащенных Т-клеток состоит по существу из CD4+ Т-клеток.

[0121] В некоторых вариантах осуществления одна или более композиций представляют собой или включают композицию CD8+ Т-клеток, которая представляет собой или включает по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99%, по меньшей мере 99,5%, по меньшей мере 99,9% или 100% или приблизительно 100% CD8+ Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления композиция CD8+ Т-клеток содержит меньше 40%, меньше 35%, меньше 30%, меньше 25%, меньше 20%, меньше 15%, меньше 10%, меньше 5%, меньше 1%, меньше 0,1% или меньше 0,01% CD4+ Т-клеток, и/или не содержит CD4+ Т-клеток, и/или не содержит или по существу не содержит CD4+ Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления композиция обогащенных Т-клеток состоит по существу из CD8+ Т-клеток.

[0122] В некоторых вариантах осуществления одну или более исходных композиций обогащенных Т-клеток замораживают, например подвергают криоконсервации и/или криозаморозке, после выделения, отбора и/или обогащения. В некоторых вариантах осуществления одну или более исходных композиций замораживают, например подвергают криоконсервации и/или криозаморозке, перед какими-либо этапами инкубирования, активации, стимуляции, модификации, трансдукции, трансфекции, культивирования, размножения, сбора и/или включения композиции клеток в состав. В конкретных вариантах осуществления одну или более криозамороженных исходных композиций хранят, например, при температуре  $-80^{\circ}\text{C}$  или приблизительно  $-80^{\circ}\text{C}$ , в течение от 12 часов до 7 дней, от 24 часов до 120 часов или от 2 дней до 5 дней. В конкретных вариантах осуществления одну или более криозамороженных исходных композиций хранят при температуре  $-80^{\circ}\text{C}$  или приблизительно  $-80^{\circ}\text{C}$ , в течение периода времени меньше 10 дней, 9 дней, 8 дней, 7 дней, 6 дней или 5 дней, 4 дней, 3 дней, 2 дней или 1 дня. В некоторых вариантах осуществления одну или более криозамороженных исходных композиций хранят при температуре  $-80^{\circ}\text{C}$  или приблизительно  $-80^{\circ}\text{C}$ , в течение или приблизительно в течение 1 дня, 2 дней, 3 дней, 4 дней, 5 дней или 6 дней.

### **В. Активация и стимуляция клеток**

[0123] В некоторых вариантах осуществления предложенные способы применяются в отношении инкубирования клеток при стимулирующих условиях. В некоторых вариантах осуществления стимулирующие условия включают условия, которые активируют или стимулируют и/или способны к активации или стимуляции сигнала в клетке, например, CD4+ Т-клетке или CD8+ Т-клетке, такого как сигнал, генерируемый TCR и/или корецептором. В некоторых вариантах осуществления стимулирующие условия включают один или более этапов культивирования, инкубирования, активации, размножения клеток с и/или в присутствии стимулирующего реагента, например, реагента, активирующего или стимулирующего и/или способного к активации или стимуляции сигнала в клетке. В некоторых вариантах осуществления

стимулирующий реагент стимулирует и/или активирует TCR и/или корцептор. В конкретных вариантах осуществления стимулирующий реагент является реагентом, описанным в Разделе I-B-1.

[0124] В некоторых вариантах осуществления одну или более композиций обогащенных Т-клеток инкубируют при стимулирующих условиях пере генетической модификацией клеток, например, трансфекции и/или трансдукции клетки, например, методом, представленным в Разделе I-C. В конкретных вариантах осуществления одну или более композиций обогащенных Т-клеток инкубируют при стимулирующих условиях, после того как одна или более композиций были выделены, отобраны, обогащены или получены из биологического образца. В конкретных вариантах осуществления одна или более композиций являются исходными композициями. В конкретных вариантах осуществления одна или более исходных композиций были предварительно подвергнуты криозаморозке и хранению и разморожены перед инкубированием.

[0125] В некоторых вариантах осуществления одна или более композиций обогащенных Т-клеток или включает две отдельных композиции, например, отдельные исходные композиции, обогащенных Т-клеток. В конкретных вариантах осуществления две отдельных композиции обогащенных Т-клеток, например, две отдельных композиции обогащенных Т-клеток, отобранные, выделенные и/или обогащенные из одного и того же биологического образца, отдельно инкубируют при стимулирующих условиях. В некоторых вариантах осуществления две отдельных композиции включают композицию обогащенных CD4<sup>+</sup> Т-клеток. В конкретных вариантах осуществления две отдельных композиции включают композицию обогащенных CD8<sup>+</sup> Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления две отдельных композиции обогащенных CD4<sup>+</sup> Т-клеток и обогащенных CD8<sup>+</sup> Т-клеток отдельно инкубируют при стимулирующих условиях.

[0126] В некоторых вариантах осуществления одну композицию обогащенных Т-клеток инкубируют при стимулирующих условиях. В некоторых вариантах осуществления одна композиция является композицией обогащенных CD4<sup>+</sup> Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления одна композиция является композицией обогащенных CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-клеток, которые были объединены из отдельных композиций перед инкубированием.

[0127] В некоторых вариантах осуществления композиция обогащенных CD4<sup>+</sup> Т-клеток, которую инкубируют при стимулирующих условиях, включает по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99%, по меньшей мере 99,5%, по меньшей мере 99,9% или 100% или приблизительно 100% CD4<sup>+</sup> Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления композиция обогащенных CD4<sup>+</sup> Т-клеток, которую инкубируют при стимулирующих условиях, включает меньше 40%, меньше 35%, меньше 30%, меньше 25%, меньше 20%, меньше 15%, меньше 10%, меньше 5%, меньше 1%, меньше 0,1% или меньше 0,01% CD8<sup>+</sup> Т-клеток, и/или не содержит CD8<sup>+</sup> Т-клеток, и/или не содержит или



по существу не содержит CD8+ Т-клеток.

[0128] В некоторых вариантах осуществления композиция обогащенных CD8+ Т-клеток, которую инкубируют при стимулирующих условиях, включают по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99%, по меньшей мере 99,5%, по меньшей мере 99,9% или 100% или приблизительно 100% CD8+ Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления композиция обогащенных CD8+ Т-клеток, которую инкубируют при стимулирующих условиях, включает меньше 40%, меньше 35%, меньше 30%, меньше 25%, меньше 20%, меньше 15%, меньше 10%, меньше 5%, меньше 1%, меньше 0,1% или меньше 0,01% CD4+ Т-клеток, и/или не содержит CD4+ Т-клеток, и/или не содержит или по существу не содержит CD4+ Т-клеток.

[0129] В некоторых вариантах осуществления отдельные композиции обогащенных CD4+ и CD8+ Т-клеток объединяют в одну композицию и инкубируют при стимулирующих условиях. В некоторых вариантах осуществления отдельные стимулированные композиции обогащенных CD4+ и обогащенных CD8+ Т-клеток объединяют в одну композицию после выполнения и/или завершения инкубирования. В некоторых вариантах осуществления отдельные стимулированные композиции стимулированных CD4+ и стимулированных CD8+ Т-клеток отдельно обрабатывают после выполнения и/или завершения инкубирования, при этом стимулированную популяцию CD4+ Т-клеток (например, инкубируемую с магнитными сферами против CD3/против CD28 в качестве стимулирующего реагента) трансдуцируют вирусным вектором, кодирующим рекомбинантный белок (например, CAR), и культивируют при условиях для размножения Т-клеток, а стимулированную популяцию CD8+ Т-клеток (например, инкубируемую с магнитными сферами против CD3/против CD28 в качестве стимулирующего реагента) трансдуцируют вирусным вектором, кодирующим рекомбинантный белок (например, CAR), такой как такой же рекомбинантный белок, как для модификации CD4+ Т-клеток от того же донора, и культивируют при условиях для размножения Т-клеток, например, в соответствии с предложенными способами.

[0130] В некоторых вариантах осуществления инкубирование при стимулирующих условиях может включать культивирование, стимуляцию, активацию, размножение, включая инкубирование в присутствии стимулирующих условий, например, условий, разработанных, чтобы вызвать пролиферацию, экспансию, активацию и/или выживание клеток в популяции, имитировать экспонирование антигена и/или примировать клетки для генетической модификации, например, для введения рекомбинантного антигенного рецептора. В конкретных вариантах осуществления стимулирующие условия могут включать одну или более конкретных сред, температуру, содержание кислорода, содержание углекислого газа, время, вещества, например, питательные вещества, аминокислоты, антибиотики, ионы и/или стимулирующие факторы, такие как цитокины, хемокины, антигены, партнеры по связыванию, слитые белки, рекомбинантные

растворимые рецепторы и любые другие средства, разработанные для активации клеток.

[0131] В некоторых аспектах стимуляцию и/или инкубирование при стимулирующих условиях проводят в соответствии с методами, такими как описанные в патенте США 6,040,1 77 (Riddell et al.), Klebanoff et al.(2012) J Immunother. 35(9):651-660, Terakura et al. (2012) Blood.1:72-82 и/или Wang et al. (2012) J Immunother. 35(9):689-701.

[0132] В некоторых вариантах осуществления клетки, например, Т-клетки, композиции клеток и/или популяции клеток, таких как CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-клетки или их композиции, популяции или субпопуляции, размножают путем добавления к композиции, инициирующей культуру, питающих клеток, таких как неделящиеся моноклеарные клетки периферической крови (МКПК) (например, так, что получаемая популяция клеток содержит по меньшей мере приблизительно 5, 10, 20 или 40 или больше МКПК питающих клеток на каждый Т-лимфоцит в исходной популяции, которую нужно размножить); и инкубирования культуры (например, в течение времени, достаточного для увеличения количества Т-клеток). В некоторых аспектах неделящиеся питающие клетки могут включать гамма-облученные МКПК питающие клетки. В некоторых вариантах осуществления МКПК облучают гамма-излучением в диапазоне приблизительно 3000-3600 рад для предотвращения деления клеток. В некоторых аспектах питающие клетки добавляют в среду перед добавлением популяций Т-клеток.

[0133] В некоторых вариантах осуществления стимулирующие условия включают температуру, подходящую для роста человеческих Т-лимфоцитов, например, по меньшей мере приблизительно 25 градусов Цельсия, обычно по меньшей мере приблизительно 30 градусов, и обычно 37 или приблизительно 37 градусов Цельсия. В некоторых вариантах осуществления изменение температуры производят во время культивирования, например с 37 градусов Цельсия до 35 градусов Цельсия. Необязательно инкубирование может дополнительно включать добавление неделящихся ЭБВ-трансформированных лимфобластных клеток (LCL) в качестве питающих клеток. LCL могут быть облучены гамма-излучением в диапазоне приблизительно 6000-10000 рад. Питающие клетки LCL в некоторых аспектах обеспечивают в любом подходящем количестве, таком как при отношении питающих клеток LCL к исходным Т-лимфоцитам по меньшей мере приблизительно 10:1.

[0134] В вариантах осуществления популяция CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup>, которые являются антигенспецифическими, может быть получена путем стимуляции наивных или антигенспецифических Т-лимфоцитов антигеном. Например, линии антигенспецифических Т-клеток или клоны могут быть получены к антигенам цитомегаловируса при выделении Т-клеток у инфицированных субъектов и стимуляции клеток *in vitro* тем же антигеном. Наивные Т-клетки также могут использоваться.

[0135] В конкретных вариантах осуществления стимулирующие условия включают инкубирование и/или культивирование клеток со стимулирующим реагентом. В конкретных вариантах осуществления стимулирующий реагент является реагентом, описанным в Разделе I-B-1. В некоторых вариантах осуществления стимулирующий

реагент содержит или включает сферу. Пример стимулирующего реагента представляет собой или включает магнитные сферы против CD3/против CD28. В некоторых вариантах осуществления начало и или инициирование инкубирования и/или культивирования клеток при стимулирующих условиях происходит при контакте и/или инкубировании клеток со стимулирующим реагентом. В конкретных вариантах осуществления клетки инкубируют до, во время и/или после генетической модификации клеток, например, введения рекомбинантного полинуклеотида в клетку, например, при трансдукции или трансфекции.

[0136] В некоторых вариантах осуществления композицию обогащенных Т-клеток инкубируют при отношении стимулирующего реагента и/или сфер, например, магнитных сфер против CD3/против CD28, к клеткам, равном или равном приблизительно 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 вариантах осуществления отношение стимулирующего реагента и/или сфер 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 до 0,9:1. В конкретных вариантах осуществления отношение стимулирующего реагента к клеткам составляет приблизительно 1:1 или 1:1.

[0137] В конкретных вариантах осуществления инкубирование клеток при отношении меньше 3:1 или меньше 3 стимулирующего реагента, например, магнитных сфер против CD3/против CD28, на клетку, таком как отношение 1:1, приводит к уменьшению количества погибших клеток во время инкубирования, например, в результате гибели клеток, вызванной активацией. В некоторых вариантах осуществления клетки инкубируют со стимулирующим реагентом, например, магнитными сферами против CD3/против CD28, при отношении сфер к клеткам меньше 3 (или 3:1 или меньше 3 сфер на клетку). В конкретных вариантах осуществления инкубирование клеток при отношении меньше 3:1 или меньше 3 сфер на клетку, таком как отношение 1:1, уменьшает количество погибших клеток во время инкубирования, например, в результате гибели клеток, вызванной активацией.

[0138] В конкретных вариантах осуществления композицию обогащенных Т-клеток инкубируют со стимулирующим реагентом, например, магнитными сферами против CD3/против CD28, при отношении меньше 3:1 стимулирующего реагента и/или сфер на клетку, таком как отношение 1:1, при этом остается по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 99%, или по меньшей мере 99,9% живых Т-клеток, например, которые являются жизнеспособными и/или не подвергаются некрозу, программируемой гибели клеток или апоптозу, в течение или по меньшей мере через 1 день, 2 дня, 3 дня, 4 дня, 5 дней, 6 дней, 7 дней или больше 7 дней после завершения инкубирования. В конкретных вариантах осуществления композицию обогащенных Т-клеток инкубируют со стимулирующим реагентом при отношении меньше 3:1 стимулирующего реагента и/или сфер на клетку, например, при отношении 1:1, при этом во время инкубирования меньше 50%, меньше

40%, меньше 30%, меньше 25%, меньше 20%, меньше 15%, меньше 10%, меньше 5%, меньше 1%, меньше 0,1% или меньше 0,01% клеток подвергаются гибели клеток, вызванной активацией.

[0139] В некоторых вариантах осуществления композицию обогащенных Т-клеток инкубируют со стимулирующим реагентом, например, магнитными сферами против CD3/против CD28, при отношении меньше 3:1 сфер на клетку, например, при отношении 1:1, при этом клетки композиции демонстрируют по меньшей мере 10%, по меньшей мере 20%, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 100%, по меньшей мере 150%, по меньшей мере 1-кратное, по меньшей мере в 2 раза, по меньшей мере в 3 раза, по меньшей мере в 4 раза, по меньшей мере в 5 раз, по меньшей мере в 10 раз, по меньшей мере в 25 раз, по меньшей мере в 50 раз или по меньшей мере в 100 раз большее выживание по сравнению с клетками, подвергнутыми примерному и/или альтернативному процессу, где композицию обогащенных Т-клеток инкубируют со стимулирующим реагентом при отношении 3:1 или больше.

[0140] В некоторых вариантах осуществления композиция обогащенных Т-клеток, инкубируемая со стимулирующим реагентом, включает от  $1,0 \times 10^5$  клеток/мл до  $1,0 \times 10^8$  клеток/мл или от приблизительно  $1,0 \times 10^5$  клеток/мл приблизительно до  $1,0 \times 10^8$  клеток/мл, например, по меньшей мере или по меньшей мере приблизительно или приблизительно  $1,0 \times 10^5$  клеток/мл,  $5 \times 10^5$  клеток/мл,  $1 \times 10^6$  клеток/мл,  $5 \times 10^6$  клеток/мл,  $1 \times 10^7$  клеток/мл,  $5 \times 10^7$  клеток/мл или  $1 \times 10^8$  клеток/мл. В некоторых вариантах осуществления композиция обогащенных Т-клеток, инкубируемая со стимулирующим реагентом, включает приблизительно  $0,5 \times 10^6$  клеток,  $1 \times 10^6$  клеток,  $1,5 \times 10^6$  клеток,  $2 \times 10^6$  клеток,  $2,5 \times 10^6$  клеток,  $3 \times 10^6$  клеток,  $3,5 \times 10^6$  клеток,  $4 \times 10^6$  клеток,  $4,5 \times 10^6$  клеток,  $5 \times 10^6$  клеток,  $5,5 \times 10^6$  клеток,  $6 \times 10^6$  клеток,  $6,5 \times 10^6$  клеток,  $7 \times 10^6$  клеток,  $7,5 \times 10^6$  клеток,  $8 \times 10^6$  клеток,  $8,5 \times 10^6$  клеток,  $9 \times 10^6$  клеток,  $9,5 \times 10^6$  клеток или  $10 \times 10^6$  клеток, например, приблизительно  $2,4 \times 10^6$  клеток.

[0141] В некоторых вариантах осуществления композицию обогащенных Т-клеток инкубируют со стимулирующим реагентом при температуре от приблизительно 25 до приблизительно 38°C, такой как от приблизительно 30 до приблизительно 37°C, например, при 37°C или приблизительно 37°C $\pm$ 2°C. В некоторых вариантах осуществления композицию обогащенных Т-клеток инкубируют со стимулирующим реагентом при содержании CO<sub>2</sub> от приблизительно 2,5% до приблизительно 7,5%, таком как от приблизительно 4% до приблизительно 6%, например, при 5% $\pm$ 0,5% или приблизительно 5% $\pm$ 0,5%. В некоторых вариантах осуществления композицию обогащенных Т-клеток инкубируют со стимулирующим реагентом при температуре 37°C или приблизительно 37°C и/или при содержании CO<sub>2</sub> 5% или приблизительно 5%.

[0142] В конкретных вариантах осуществления стимулирующие условия включают инкубирование и/или культивирование композиции обогащенных Т-клеток с и/или в

присутствии одного или более цитокинов. В конкретных вариантах осуществления один или более цитокинов являются рекомбинантными цитокинами. В некоторых вариантах осуществления один или более цитокинов являются человеческими рекомбинантными цитокинами. В некоторых вариантах осуществления один или более цитокинов связываются и/или способны к связыванию с рецепторами, которые экспрессируются Т-клетками и/или являются эндогенными для Т-клеток. В конкретных вариантах осуществления один или более цитокинов представляют собой или включают члена семейства цитокинов с пучком из 4 альфа-спиралей. В некоторых вариантах осуществления члены семейства цитокинов с пучком из 4 альфа-спиралей включают, без ограничения перечисленными, интерлейкин 2 (IL-2), интерлейкин 4 (IL-4), интерлейкин 7 (IL-7), интерлейкин 9 (IL-9), интерлейкин 12 (IL-12), интерлейкин 15 (IL-15), гранулоцитарный колониестимулирующий фактор (Г-КСФ) и гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (ГМ-КСФ). В некоторых вариантах осуществления один или более цитокинов представляют собой или включают IL-15. В конкретных вариантах осуществления один или более цитокинов представляют собой или включают IL-7. В конкретных вариантах осуществления один или более цитокинов представляют собой или включают IL-2. В некоторых вариантах осуществления стимулирующие условия включают инкубирование композиции обогащенных Т-клеток, таких как обогащенные CD4+ Т-клетки или обогащенные CD8+ Т-клетки, в присутствии стимулирующего реагента, например, магнитных сфер против CD3/против CD28, как описано и в присутствии одного или более рекомбинантных цитокинов.

[0143] В конкретных вариантах осуществления композицию обогащенных CD4+ Т-клеток инкубируют с IL-2, например, рекомбинантным IL-2. Без ограничения теорией, конкретные варианты осуществления предусматривают, что CD4+ Т-клетки, полученные у некоторых субъектов, не продуцируют или продуцируют не достаточно, IL-2 в количествах, которые обеспечивают рост, деление и размножение в течение всего процесса создания композиции готовых клеток, например, модифицированных клеток, подходящих для применения в клеточной терапии. В некоторых вариантах осуществления инкубирование композиции обогащенных CD4+ Т-клеток при стимулирующих условиях в присутствии рекомбинантного IL-2 увеличивает возможность или вероятность того, что CD4+ Т-клетки композиции сохраняют жизнеспособность, способность к росту, размножению и/или активации во время этапа инкубирования и в течение всего процесса. В некоторых вариантах осуществления инкубирование композиции обогащенных CD4+ Т-клеток в присутствии рекомбинантного IL-2 увеличивает возможность и/или вероятность того, что готовая композиция обогащенных CD4+ Т-клеток, например, модифицированных CD4+ Т-клеток, подходящих для клеточной терапии, будет получена из композиции обогащенных CD4+ Т-клеток, по меньшей мере на 0,5%, по меньшей мере на 1%, по меньшей мере на 2%, по меньшей мере на 3%, по меньшей мере на 4%, по меньшей мере на 5%, по меньшей мере на 6%, по меньшей мере на 7%, по меньшей мере на 8%, по меньшей мере на 9%, по меньшей мере на 10%, по меньшей мере на 11%, по

меньшей мере на 12%, по меньшей мере на 13%, по меньшей мере на 14%, по меньшей мере на 15%, по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 40%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 100%, по меньшей мере на 150%, по меньшей мере 1-кратно, по меньшей мере в 2 раза, по меньшей мере в 3 раза, по меньшей мере в 4 раза, по меньшей мере в 5 раз, по меньшей мере в 10 раз, по меньшей мере в 25 раз, по меньшей мере в 50 раз или по меньшей мере в 100 раз по сравнению с альтернативным и/или примерным способом, в котором композицию обогащенных CD4+ Т-клеток не инкубируют в присутствии рекомбинантного IL-2.

[0144] В некоторых вариантах осуществления количество или концентрация одного или более цитокинов измеряют и/или количественно определяют в Международных единицах (МЕ). Международные единицы могут использоваться для количественного определения витаминов, гормонов, цитокинов, вакцин, препаратов крови и подобных биологически активных веществ. В некоторых вариантах осуществления МЕ представляют собой или включают единицы измерения активности биологических препаратов в сравнении с международным эталоном удельного веса и концентрации, например, 1-м Международным стандартом ВОЗ человеческого IL-2, 86/504. Международные единицы являются единственным признанным и стандартизированным методом выражения единиц биологической активности, которые опубликованы и получены в результате международной совместной научно-исследовательской работы. В конкретных вариантах осуществления МЕ для композиции, образца или источника цитокина могут быть получены при сравнительном тестировании продукта с аналогичным стандартным продуктом ВОЗ. Например, в некоторых вариантах осуществления МЕ/мг композиции, образца или источника человеческого рекомбинантного IL-2, IL-7 или IL-15 сравнивают со стандартным продуктом ВОЗ IL-2 (код NIBSC: 86/500), стандартным продуктом ВОЗ IL-17 (код NIBSC: 90/530) и стандартным продуктом ВОЗ IL-15 (код NIBSC: 95/554), соответственно.

[0145] В некоторых вариантах осуществления биологическая активность в МЕ/мг эквивалентна  $(ED_{50} \text{ в нг/мл})^{-1} \times 10^6$ . В конкретных вариантах осуществления  $ED_{50}$  рекомбинантного человеческого IL-2 или IL-15 эквивалентна концентрации, требуемой для полумаксимальной стимуляции пролиферации клеток (расщепления ХТТ) клетками СТЛЛ-2. В некоторых вариантах осуществления  $ED_{50}$  рекомбинантного человеческого IL-7 эквивалентна концентрации, требуемой для полумаксимальной стимуляции пролиферации ФГА-активированных лимфоцитов периферической крови человека. Детали, касающиеся анализов и вычислений МЕ IL-2, обсуждаются в публикациях Wadhwa et al., *Journal of Immunological Methods* (2013), 379(1-2):1-7; и Gearing and Thorpe, *Journal of Immunological Methods* (1988), 114(1-2):3-9; детали, касающиеся анализов и вычислений МЕ IL-15, обсуждаются в публикации Soman et al. *Journal of Immunological Methods* (2009) 348(1-2):83-94; которые настоящим включены посредством отсылок во

всей полноте.

[0146] В конкретных вариантах осуществления композицию обогащенных CD8+ Т-клеток инкубируют при стимулирующих условиях в присутствии IL-2 и/или IL-15. В некоторых вариантах осуществления композицию обогащенных CD4+ Т-клеток инкубируют при стимулирующих условиях в присутствии IL-2, IL-7 и/или IL-15. В некоторых вариантах осуществления IL-2, IL-7 и/или IL-15 являются рекомбинантными. В некоторых вариантах осуществления IL-2, IL-7 и/или IL-15 являются человеческими. В конкретных вариантах осуществления один или более цитокинов представляют или включают человеческий рекомбинантный IL-2, IL-7 и/или IL-15. В некоторых аспектах инкубирование обогащенной композиции Т-клеток также включает присутствие стимулирующего реагента, например, магнитных сфер против CD3/против CD28.

[0147] В некоторых вариантах осуществления клетки инкубируют с цитокином, например, рекомбинантным человеческим цитокином, в концентрации от 1 МЕ/мл до 1000 МЕ/мл, от 10 МЕ/мл до 50 МЕ/мл, от 50 МЕ/мл до 100 МЕ/мл, от 100 МЕ/мл до 200 МЕ/мл, от 100 МЕ/мл до 500 МЕ/мл, от 250 МЕ/мл до 500 МЕ/мл или от 500 МЕ/мл до 1000 МЕ/мл.

[0148] В некоторых вариантах осуществления композицию обогащенных Т-клеток инкубируют с IL-2, например, человеческим рекомбинантным IL-2, в концентрации от 1 МЕ/мл до 200 МЕ/мл, от 10 МЕ/мл до 200 МЕ/мл, от 10 МЕ/мл до 100 МЕ/мл, от 50 МЕ/мл до 150 МЕ/мл, от 80 МЕ/мл до 120 МЕ/мл, от 60 МЕ/мл до 90 МЕ/мл или от 70 МЕ/мл до 90 МЕ/мл. В конкретных вариантах осуществления композицию обогащенных Т-клеток инкубируют с рекомбинантным IL-2 в концентрации, равной или равной приблизительно 50 МЕ/мл, 55 МЕ/мл, 60 МЕ/мл, 65 МЕ/мл, 70 МЕ/мл, 75 МЕ/мл, 80 МЕ/мл, 85 МЕ/мл, 90 МЕ/мл, 95 МЕ/мл, 100 МЕ/мл, 110 МЕ/мл, 120 МЕ/мл, 130 МЕ/мл, 140 МЕ/мл или 150 МЕ/мл. В некоторых вариантах осуществления композицию обогащенных Т-клеток инкубируют в присутствии 85 МЕ/мл или приблизительно 85 МЕ/мл рекомбинантного IL-2. В некоторых вариантах осуществления композиция, инкубируемая с рекомбинантным IL-2, обогащена популяцией Т-клеток, например, CD4+ Т-клеток и/или CD8+ Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления популяция Т-клеток является популяцией CD4+ Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления композиция обогащенных Т-клеток является композицией обогащенных CD8+ Т-клеток. В конкретных вариантах осуществления композиция обогащенных Т-клеток обогащена CD8+ Т-клетками, где композицию не обогащают CD4+ Т-клетками, и/или где CD4+ Т-клетки отрицательно отбирают или элиминируют из композиции. В некоторых вариантах осуществления композиция обогащенных Т-клеток является композицией обогащенных CD4+ Т-клеток. В конкретных вариантах осуществления композиция обогащенных Т-клеток обогащена CD4+ Т-клетками, где композицию не обогащают CD8+ Т-клетками, и/или где CD8+ Т-клетки отрицательно отбирают или элиминируют из композиции. В некоторых вариантах осуществления обогащенную композицию CD4+ Т-клеток, инкубируемую с рекомбинантным IL-2, также могут инкубировать с рекомбинантным IL-7 и/или

рекомбинантным ИЛ-15, например, в описанных количествах. В некоторых вариантах осуществления обогащенную композицию CD8+ Т-клеток, инкубируемую с рекомбинантным ИЛ-2, также могут инкубировать с рекомбинантным ИЛ-15, например, в описанных количествах.

[0149] В некоторых вариантах осуществления композицию обогащенных Т-клеток инкубируют с рекомбинантным ИЛ-7, например, человеческим рекомбинантным ИЛ-7, в концентрации от 100 МЕ/мл до 2000 МЕ/мл, от 500 МЕ/мл до 1000 МЕ/мл, от 100 МЕ/мл до 500 МЕ/мл, от 500 МЕ/мл до 750 МЕ/мл, от 750 МЕ/мл до 1000 МЕ/мл или от 550 МЕ/мл до 650 МЕ/мл. В конкретных вариантах осуществления композицию обогащенных Т-клеток инкубируют с рекомбинантным ИЛ-7 в концентрации, равной или равной приблизительно 50 МЕ/мл, 100 МЕ/мл, 150 МЕ/мл, 200 МЕ/мл, 250 МЕ/мл, 300 МЕ/мл, 350 МЕ/мл, 400 МЕ/мл, 450 МЕ/мл, 500 МЕ/мл, 550 МЕ/мл, 600 МЕ/мл, 650 МЕ/мл, 700 МЕ/мл, 750 МЕ/мл, 800 МЕ/мл, 750 МЕ/мл, 750 МЕ/мл, 750 МЕ/мл или 1000 МЕ/мл. В конкретных вариантах осуществления композицию обогащенных Т-клеток инкубируют в присутствии 600 МЕ/мл или приблизительно 600 МЕ/мл рекомбинантного ИЛ-7. В некоторых вариантах осуществления композиция, инкубируемая с рекомбинантным ИЛ-7, обогащена популяцией Т-клеток, например, CD4+ Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления обогащенную композицию CD4+ Т-клеток, инкубируемую с рекомбинантным ИЛ-7, также могут инкубировать с рекомбинантным ИЛ-2 и/или рекомбинантным ИЛ-15, например, в описанных количествах. В конкретных вариантах осуществления композиция обогащенных Т-клеток обогащена CD4+ Т-клетками, где композицию не обогащают CD8+ Т-клетками, и/или где CD8+ Т-клетки отрицательно отбирают или элиминируют из композиции. В некоторых вариантах осуществления обогащенную композицию CD8+ Т-клеток не инкубируют с рекомбинантным ИЛ-7.

[0150] В некоторых вариантах осуществления композицию обогащенных Т-клеток инкубируют с рекомбинантным ИЛ-15, например, человеческим рекомбинантным ИЛ-15, в концентрации от 0,1 МЕ/мл до 100 МЕ/мл, от 1 МЕ/мл до 100 МЕ/мл, от 1 МЕ/мл до 50 МЕ/мл, от 5 МЕ/мл до 25 МЕ/мл, от 25 МЕ/мл до 50 МЕ/мл, от 5 МЕ/мл до 15 МЕ/мл или от 10 МЕ/мл до 100 МЕ/мл. В конкретных вариантах осуществления композицию обогащенных Т-клеток инкубируют с рекомбинантным ИЛ-15 в концентрации, равной или равной приблизительно 1 МЕ/мл, 2 МЕ/мл, 3 МЕ/мл, 4 МЕ/мл, 5 МЕ/мл, 6 МЕ/мл, 7 МЕ/мл, 8 МЕ/мл, 9 МЕ/мл, 10 МЕ/мл, 11 МЕ/мл, 12 МЕ/мл, 13 МЕ/мл, 14 МЕ/мл, 15 МЕ/мл, 20 МЕ/мл, 25 МЕ/мл, 30 МЕ/мл, 40 МЕ/мл или 50 МЕ/мл. В некоторых вариантах осуществления композицию обогащенных Т-клеток инкубируют в присутствии 10 МЕ/мл или приблизительно 10 МЕ/мл рекомбинантного ИЛ-15. В некоторых вариантах осуществления композиция, инкубируемая с рекомбинантным ИЛ-15, обогащена популяцией Т-клеток, например, CD4+ Т-клеток и/или CD8+ Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления популяция Т-клеток является популяцией CD4+ Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления композиция обогащенных Т-клеток является композицией обогащенных CD8+ Т-клеток. В конкретных вариантах осуществления



композиция обогащенных Т-клеток обогащена CD8+ Т-клетками, где композицию не обогащают CD4+ Т-клетками, и/или где CD4+ Т-клетки отрицательно отбирают или элиминируют из композиции. В некоторых вариантах осуществления композиция обогащенных Т-клеток является композицией обогащенных CD4+ Т-клеток. В конкретных вариантах осуществления композиция обогащенных Т-клеток обогащена CD4+ Т-клетками, где композицию не обогащают CD8+ Т-клетками, и/или где CD8+ Т-клетки отрицательно отбирают или элиминируют из композиции. В некоторых вариантах осуществления обогащенную CD4+ композицию Т-клеток, инкубируемую с рекомбинантным IL-15, также могут инкубировать с рекомбинантным IL-7 и/или рекомбинантным IL-2, например, в описанных количествах. В некоторых вариантах осуществления обогащенную композицию CD8+ Т-клеток, инкубируемую с рекомбинантным IL-15, также могут инкубировать с рекомбинантным IL-2, например, в описанных количествах.

[0151] В конкретных вариантах осуществления клетки, такие как обогащенные CD4+ Т-клетки и/или обогащенные CD8+ Т-клетки, инкубируют со стимулирующим реагентом в присутствии одного или более антиоксидантов. В некоторых вариантах осуществления антиоксиданты включают, без ограничения перечисленными, один или более антиоксидантов, включающих токоферол, токотриенол, альфа-токоферол, бета-токоферол, гамма-токоферол, дельта-токоферол, альфа-токотриенол, бета-токотриенол, альфа-токоферолхинон, тролокс (6-гидрокси-2,5,7,8-тетраметилхроман-2-карбоновую кислоту), бутилгидроксианизол (BHA), бутилгидрокситолуол (BHT), флавоноиды, изофлавоны, ликопин, бета-каротин, селен, убихинон, лютеин, S-аденозилметионин, глутатион, таурин, N-ацетилцистеин (NAC), лимонную кислоту, L-карнитин, BHT, монотиоглицерин, аскорбиновую кислоту, пропилгаллат, метионин, цистеин, гомоцистеин, глутатион, цистамин и цистатионин и/или глицин-глицин-гистидин. В некоторых аспектах инкубирование обогащенной композиции Т-клеток, такой как обогащенные CD4+ Т-клетки и/или обогащенные CD8+ Т-клетки, с антиоксидантом также включает присутствие стимулирующего реагента, например, магнитных сфер против CD3/против CD28, и одного или более рекомбинантных цитокинов, таких как описанные.

[0152] В некоторых вариантах осуществления один или более антиоксидантов представляют собой или включают серосодержащий антиоксидант. В некоторых вариантах осуществления серосодержащий антиоксидант может включать тиолсодержащие антиоксиданты и/или антиоксиданты, которые содержат один или более атомов серы, например, в кольцевой структуре. В некоторых вариантах осуществления серосодержащие антиоксиданты могут включать, например, N-ацетилцистеин (NAC) и 2,3-димеркаптопропанол (DMP), L-2-оксо-4-тиазолидинкарбоксилат (OTC) и липоевую кислоту. В конкретных вариантах осуществления серосодержащий антиоксидант является предшественником глутатиона. В некоторых вариантах осуществления предшественник глутатиона является молекулой, которая может быть модифицирована в одной или более стадиях в клетке с получением глутатиона. В конкретных вариантах осуществления

предшественник глутатиона может включать, без ограничения, N-ацетилцистеин (NAC), L-2-оксотиазолидин-4-карбоновую кислоту (процистеин), липоевую кислоту, S-аллилцистеин или хлорид метилметионинсульфония.

[0153] В некоторых вариантах осуществления инкубирование клеток, таких как обогащенные CD4+ Т-клетки и/или обогащенные CD8+ Т-клетки, при стимулирующих условиях включает инкубирование клеток в присутствии одного или более антиоксидантов. В конкретных вариантах осуществления клетки стимулируют стимулирующим реагентом в присутствии одного или более антиоксидантов. В некоторых вариантах осуществления клетки инкубируют в присутствии от 1 нг/мл до 100 нг/мл, от 10 нг/мл до 1 мкг/мл, от 100 нг/мл до 10 мкг/мл, от 1 мкг/мл до 100 мкг/мл, от 10 мкг/мл до 1 мг/мл, от 100 мкг/мл до 1 мг/мл, от 1 500 мкг/мл до 2 мг/мл, от 500 мкг/мл до 5 мг/мл, от 1 мг/мл до 10 мг/мл или от 1 мг/мл до 100 мг/мл одного или более антиоксидантов. В некоторых вариантах осуществления клетки инкубируют в присутствии одного или более антиоксидантов в количестве, равном или равном приблизительно 1 нг/мл, 10 нг/мл, 100 нг/мл, 1 мкг/мл, 10 мкг/мл, 100 мкг/мл, 0,2 мг/мл, 0,4 мг/мл, 0,6 мг/мл, 0,8 мг/мл, 1 мг/мл, 2 мг/мл, 3 мг/мл, 4 мг/мл, 5 мг/мл, 10 мг/мл, 20 мг/мл, 25 мг/мл, 50 мг/мл, 100 мг/мл, 200 мг/мл, 300 мг/мл, 400 мг/мл, 500 мг/мл. В некоторых вариантах осуществления один или более антиоксидантов представляют собой или включают серосодержащий антиоксидант. В конкретных вариантах осуществления один или более антиоксидантов представляют собой или включают предшественник глутатиона.

[0154] В некоторых вариантах осуществления один или более антиоксидантов представляют собой или включают N-ацетилцистеин (NAC). В некоторых вариантах осуществления инкубирование клеток, таких как обогащенные CD4+ Т-клетки и/или обогащенные CD8+ Т-клетки, при стимулирующих условиях включает инкубирование клеток в присутствии NAC. В конкретных вариантах осуществления клетки стимулируют стимулирующим реагентом в присутствии NAC. В некоторых вариантах осуществления клетки инкубируют в присутствии от 1 нг/мл до 100 нг/мл, от 10 нг/мл до 1 мкг/мл, от 100 нг/мл до 10 мкг/мл, от 1 мкг/мл до 100 мкг/мл, от 10 мкг/мл до 1 мг/мл, от 100 мкг/мл до 1 мг/мл, от 1-500 мкг/мл до 2 мг/мл, от 500 мкг/мл до 5 мг/мл, от 1 мг/мл до 10 мг/мл или от 1 мг/мл до 100 мг/мл NAC. В некоторых вариантах осуществления клетки инкубируют в присутствии NAC в количестве, равном или равном приблизительно 1 нг/мл, 10 нг/мл, 100 нг/мл, 1 мкг/мл, 10 мкг/мл, 100 мкг/мл, 0,2 мг/мл, 0,4 мг/мл, 0,6 мг/мл, 0,8 мг/мл, 1 мг/мл, 2 мг/мл, 3 мг/мл, 4 мг/мл, 5 мг/мл, 10 мг/мл, 20 мг/мл, 25 мг/мл, 50 мг/мл, 100 мг/мл, 200 мг/мл, 300 мг/мл, 400 мг/мл, 500 мг/мл. В некоторых вариантах осуществления клетки инкубируют с 0,8 мг/мл или приблизительно 0,8 мг/мл.

[0155] В конкретных вариантах осуществления инкубирование композиции обогащенных Т-клеток, таких как обогащенные CD4+ Т-клетки и/или обогащенные CD8+ Т-клетки, в присутствии одного или более антиоксидантов, например NAC, уменьшает активацию в клетках по сравнению с клетками, которые инкубируют в альтернативных и/или примерных процессах без присутствия антиоксидантов. В некоторых вариантах

осуществления снижение активации измеряют по экспрессии одного или более маркеров активации в клетке. В некоторых вариантах осуществления маркеры активации включают, без ограничения перечисленными, увеличение сложности внутриклеточной структуры (например, при определении путем измерения бокового светорассеяния (SSC)), увеличение размера клетки (например, при определении путем измерения диаметра клетки и/или прямого светорассеяния (FSC)), увеличение экспрессии CD27 и/или уменьшение экспрессии CD25. В некоторых вариантах осуществления клетки композиции имеют отрицательную, сниженную или низкую экспрессию и/или степень маркеров активации при исследовании во время или после инкубирования, модификации, трансдукции, трансфекции, размножения или иготовления готового состава, или во время или после любой стадии процесса, проходящей после инкубирования. В некоторых вариантах осуществления клетки композиции имеют отрицательную, сниженную или низкую экспрессию и/или степень маркеров активации после завершения процесса. В конкретных вариантах осуществления клетки готовой композиции имеют отрицательную, сниженную или низкую экспрессию и/или степень маркеров активации.

[0156] В некоторых вариантах осуществления проточную цитометрию используют для определения относительного размера клеток. В конкретных вариантах осуществления параметры FSC и SSC используют для анализа клеток и чтобы отличать клетки друг от друга по размеру и сложности внутреннего строения. В конкретных вариантах осуществления частицу или сферу известного размера могут измерять в качестве стандарта для определения реального размера клеток. В некоторых вариантах осуществления проточная цитометрия используется в сочетании с окрашиванием, например меченым антителом, для измерения или количественного определения экспрессии поверхностного белка, такого как маркер активации, например, CD25 или CD27.

[0157] В некоторых вариантах осуществления композицию обогащенных Т-клеток, таких как обогащенные CD4+ Т-клетки и/или обогащенные CD8+ Т-клетки, инкубируют в присутствии одного или более антиоксидантов, например, NAC, при этом диаметр клеток уменьшается по меньшей мере на 0,25 мкм, 0,5 мкм, 0,75 мкм, 1,0 мкм, 1,5 мкм, 2 мкм, 2,5 мкм, 3 мкм, 3,5 мкм, 4 мкм, 4,5 мкм, 5 мкм или больше чем на 5 мкм по сравнению с клетками, инкубируемыми в альтернативном и/или примерном процессе, где инкубирование не проводят в присутствии антиоксиданта. В конкретных вариантах осуществления композицию обогащенных Т-клеток инкубируют в присутствии одного или более антиоксидантов, например, NAC, при этом размер клеток при измерении по FSC уменьшается по меньшей мере на 1%, по меньшей мере на 5%, по меньшей мере на 10%, по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 40%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85% или по меньшей мере на 90% по сравнению с клетками, инкубируемыми в альтернативном и/или примерном процессе, где инкубирование не проводят в присутствии антиоксиданта.

[0158] В некоторых вариантах осуществления композицию обогащенных Т-клеток, таких как обогащенные CD4+ Т-клетки и/или обогащенные CD8+ Т-клетки, инкубируют в присутствии одного или более антиоксидантов, например, NAC, при этом сложность внутриклеточной структуры, при измерении по SSC, уменьшается по меньшей мере на 1%, по меньшей мере на 5%, по меньшей мере на 10%, по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 40%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85% или по меньшей мере на 90% по сравнению с клетками, инкубируемыми в альтернативном и/или примерном процессе, где инкубирование не проводят в присутствии антиоксиданта.

[0159] В конкретных вариантах осуществления композицию обогащенных Т-клеток, таких как обогащенные CD4+ Т-клетки и/или обогащенные CD8+ Т-клетки, инкубируют в присутствии одного или более антиоксидантов, например, NAC, при этом экспрессия CD27, например, при измерении с помощью проточной цитометрии, снижается по меньшей мере на 1%, по меньшей мере на 5%, по меньшей мере на 10%, по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 40%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95% или по меньшей мере на 99% по сравнению с клетками, инкубируемыми в альтернативном и/или примерном процессе, где инкубирование не проводят в присутствии антиоксиданта.

[0160] В некоторых вариантах осуществления композицию обогащенных Т-клеток, таких как обогащенные CD4+ Т-клетки и/или обогащенные CD8+ Т-клетки, инкубируют в присутствии одного или более антиоксидантов, например, NAC, при этом экспрессия CD25, например, при измерении с помощью проточной цитометрии, повышается по меньшей мере на 1%, по меньшей мере на 5%, по меньшей мере на 10%, по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 40%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 100%, по меньшей мере на 150%, по меньшей мере 1-кратно, по меньшей мере в 2 раза, по меньшей мере в 3 раза, по меньшей мере в 4 раза, по меньшей мере в 5 раз, по меньшей мере в 10 раз, по меньшей мере в 25 раз, по меньшей мере в 50 раз или по меньшей мере в 100 раз по сравнению с клетками, инкубируемыми в альтернативном и/или примерном процессе, где инкубирование не проводят в присутствии антиоксиданта.

[0161] В конкретных вариантах осуществления инкубирование композиции обогащенных Т-клеток, таких как обогащенные CD4+ Т-клетки и/или обогащенные CD8+ Т-клетки, в присутствии одного или более антиоксидантов, например, NAC, увеличивает экспансию, например, во время этапа или стадии инкубирования или культивирования, как описано в Разделе I-D. В некоторых вариантах осуществления композиция обогащенных клеток достигает 2-кратной, 2,5-кратной, 3-кратной, 3,5-кратной, 4-кратной,

4,5-кратной, 5-кратной, 6-кратной, 7-кратной, 8-кратной, девятикратной, 10-кратной или больше чем 10-кратной экспансии в течение 14 дней, 12 дней, 10 дней, 9 дней, 8 дней, 7 дней, 6 дней, 5 дней, 4 дней или в течение 3 дней после начала культивирования. В некоторых вариантах осуществления композицию обогащенных Т-клеток инкубируют в присутствии одного или более антиоксидантов, при этом клетки композиций подвергаются по меньшей мере 10%, по меньшей мере 20%, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 100%, по меньшей мере 150%, по меньшей мере 1-кратной, по меньшей мере в 2 раза, по меньшей мере в 3 раза, по меньшей мере в 4 раза, по меньшей мере в 5 раз, по меньшей мере в 10 раз более быстрой скорости экспансии во время культивирования, чем культивируемые клетки, которые инкубировали в альтернативном и/или примерном процессе, где инкубирование не проводят в присутствии антиоксиданта.

[0162] В конкретных вариантах осуществления инкубирование композиции обогащенных клеток, таких как обогащенные CD4+ Т-клетки и/или обогащенные CD8+ Т-клетки, в присутствии одного или более антиоксидантов, например, NAC, уменьшает величину гибели клеток, например, при апоптозе. В некоторых вариантах осуществления композицию обогащенных Т-клеток инкубируют в присутствии одного или более антиоксидантов, например, NAC, при этом остается по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 99%, или по меньшей мере 99,9% живых клеток, например, не подвергающихся апоптозу, в течение или по меньшей мере через 1 день, 2 дня, 3 дня, 4 дня, 5 дней, 6 дней, 7 дней, или больше чем 7 дней после завершения инкубирования. В некоторых вариантах осуществления композицию инкубируют в присутствии одного или более антиоксидантов, например, NAC, при этом клетки композиции демонстрируют по меньшей мере 10%, по меньшей мере 20%, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 100%, по меньшей мере 150%, по меньшей мере 1-кратнок, по меньшей мере в 2 раза, по меньшей мере в 3 раза, по меньшей мере в 4 раза, по меньшей мере в 5 раз, по меньшей мере в 10 раз, по меньшей мере в 25 раз, по меньшей мере в 50 раз или по меньшей мере в 100 раз большее выживание по сравнению с клетками, подвергаемыми примерному и/или альтернативному процессу, где клетки не инкубируют в присутствии одного или более антиоксидантов.

[0163] В конкретных вариантах осуществления композицию обогащенных Т-клеток, таких как обогащенные CD4+ Т-клетки и/или обогащенные CD8+ Т-клетки, инкубируют в присутствии одного или более антиоксидантов, например, NAC, при этом экспрессия каспазы, например, экспрессия каспазы 3, снижается по меньшей мере на 1%, по меньшей мере на 5%, по меньшей мере на 10%, по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 40%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на

60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95% или по меньшей мере на 99% по сравнению с клетками, инкубируемыми в альтернативном и/или примерном процессе, где инкубирование не проводят в присутствии антиоксиданта.

[0164] В некоторых вариантах осуществления композиции или клетки, такие как обогащенные CD4+ Т-клетки и/или обогащенные CD8+ Т-клетки, инкубируют в присутствии стимулирующих условий или стимулирующего средства, таких как описано. Такие условия включают условия, подобранные, чтобы стимулировать пролиферацию, размножение, активацию и/или выживание клеток в популяции, имитировать экспонирование антигена и/или примировать клетки для генетической модификации, например, для введения рекомбинантного антигенного рецептора. Примеры стимулирующих реагентов, таких как магнитные сферы против CD3/против CD28, описаны ниже. Инкубирование со стимулирующим реагентом также могут проводить в присутствии одного или более стимулирующих цитокинов, например, в присутствии одного или более из рекомбинантного IL-2, рекомбинантного IL-7 и/или рекомбинантного IL-15, и/или в присутствии по меньшей мере одного антиоксиданта, такого как NAC, как описано выше. В некоторых вариантах осуществления композиции обогащенных CD4+ Т-клеток инкубируют при стимулирующих условиях со стимулирующим средством, рекомбинантным IL-2, рекомбинантным IL-7, рекомбинантным IL-15 и NAC, например, в описанных количествах. В некоторых вариантах осуществления композиции обогащенных CD8+ Т-клеток инкубируют при стимулирующих условиях со стимулирующим средством, рекомбинантным IL-2, рекомбинантным IL-15 и NAC, например, в описанных количествах.

[0165] В некоторых вариантах осуществления условия стимуляции и/или активации могут включать одну или более конкретных сред, температуру, содержание кислорода, содержание углекислого газа, время, вещества, например, питательные вещества, аминокислоты, антибиотики, ионы и/или стимулирующие факторы, такие как цитокины, хемокины, антигены, партнеры по связыванию, слитые белки, рекомбинантные растворимые рецепторы и любые другие вещества, предназначенные для активации клеток.

[0166] В некоторых аспектах инкубирование проводят в соответствии с методами, такими как описанные в патенте США 6,040,177 (Riddell et al.), Klebanoff et al.(2012) J Immunother. 35(9):651-660, Terakura et al. (2012) Blood 1:72-82, и/или Wang et al. (2012) J Immunother. 35(9):689-701.

[0167] В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере часть инкубирования в присутствии одного или более стимулирующих условий или стимулирующих средств проводят во внутренней полости центрифужной камеры, например, при вращении ротора центрифуги, как описано в Международной публикации WO2016/073602. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере часть инкубирования, проводимая в центрифужной камере, включает смешивание с реагентом

или реагентами, чтобы вызвать стимуляцию и/или активацию. В некоторых вариантах осуществления клетки, такие как отобранные клетки, смешивают при стимулирующем условии или со стимулирующим средством в центрифужной камере. В некоторых аспектах таких процессов объем клеток смешивают с некоторым количеством одного или более стимулирующих условий или средств, которое намного меньше, чем обычно используемое при проведении подобных стимуляций в планшете для культуры клеток или другой системе.

[0168] В некоторых вариантах осуществления стимулирующее средство добавляют к клеткам в полости камеры в количестве, которое существенно меньше (например, составляет не больше 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70% или 80% от количества) по сравнению с количеством стимулирующего средства, которое обычно используется или необходимо для достижения примерно такой же или подобной эффективности отбора из такого же количества клеток или такого же объема клеток, когда отбор проводят без смешивания в центрифужной камере, например, в пробирке или мешке при периодическом встряхивании или вращении. В некоторых вариантах осуществления инкубирование проводят при добавлении буфера для инкубирования к клеткам и стимулирующему средству до получения требуемого объема, с инкубированием реагента в объеме, например, от приблизительно 10 мл до приблизительно 200 мл или от приблизительно 20 мл до приблизительно 125 мл, например, по меньшей мере или по меньшей мере приблизительно или приблизительно 10 мл, 20 мл, 30 мл, 40 мл, 50 мл, 60 мл, 70 мл, 80 мл, 90 мл, 100 мл, 105 мл, 110 мл, 115 мл, 120 мл, 125 мл, 130 мл, 135 мл, 140 мл, 145 мл, 150 мл, 160 мл, 170 мл, 180 мл, 190 мл или 200 мл. В некоторых вариантах осуществления буфер для инкубирования и стимулирующее средство предварительно смешивают перед добавлением к клеткам. В некоторых вариантах осуществления буфер для инкубирования и стимулирующее средство добавляют к клеткам отдельно. В некоторых вариантах осуществления стимулирующее инкубирование проводят в условиях периодического мягкого перемешивания, которое может способствовать возникновению энергетически выгодных взаимодействий и, таким образом, позволить использовать в целом меньше стимулирующего средства при достижении стимуляции и активации клеток.

[0169] В некоторых вариантах осуществления инкубирование обычно проводят в условиях смешивания, например, в присутствии вращения, обычно при относительно низкой силе или скорости, например, скорости ниже, чем используемая для осаждения клеток, такой как от 600 об/мин до 1700 об/мин или от приблизительно 600 об/мин до приблизительно 1700 об/мин (например, составляющей или составляющей приблизительно или по меньшей мере 600 об/мин, 1000 об/мин или 1500 об/мин, или 1700 об/мин), такой как при RCF в образце или на стенке камеры или другом контейнере от 80 g до 100 g или от приблизительно 80 g до приблизительно 100 g (например, составляющей или составляющей приблизительно или по меньшей мере 80 g, 85 g, 90 g, 95 g или 100 g). В некоторых вариантах осуществления вращение проводят с использованием повторных

интервалов вращения при такой низкой скорости с последующим периодом выдерживания, например, при вращении и/или выдерживании в течение 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 секунд, таких как вращение приблизительно 1 или 2 секунды с последующим перерывом в течение приблизительно 5, 6, 7 или 8 секунд.

[0170] В некоторых вариантах осуществления общая продолжительность инкубирования, например со стимулирующим средством, составляет от или от приблизительно 1 часа до 96 часов, от 1 часа до 72 часов, от 1 часа до 48 часов, от 4 часов до 36 часов, от 8 часов до 30 часов, от 18 часов до 30 часов или от 12 часов до 24 часов, например, по меньшей мере или по меньшей мере приблизительно или приблизительно 6 часов, 12 часов, 18 часов, 24 часа, 36 часов или 72 часа. В некоторых вариантах осуществления дополнительно инкубирование проводят в течение некоторого времени от или от приблизительно 1 часа до 48 часов, от 4 часов до 36 часов, от 8 часов до 30 часов или от 12 часов до 24 часов, включительно.

[0171] В некоторых вариантах осуществления клетки культивируют, выращивают и/или инкубируют при стимулирующих условиях до и/или во время этапа введения полинуклеотида, например, полинуклеотида, кодирующего рекомбинантный рецептор, в клетки, например, при трансдукции и/или трансфекции, например, как описано в Разделе I-C. В некоторых вариантах осуществления клетки культивируют, выращивают и/или инкубируют при стимулирующих условиях в течение периода времени от 30 минут до 2 часов, от 1 часа до 8 часов, от 1 часа до 6 часов, от 6 часов до 12 часов, от 12 часов до 18 часов, от 16 часов до 24 часов, от 12 часов до 36 часов, от 24 часов до 48 часов, от 24 часов до 72 часов, от 42 часов до 54 часов, от 60 часов до 120 часов, от 96 часов до 120 часов, от 90 часов и от 1 дня до 7 дней, от 3 дней до 8 дней, от 1 дня до 3 дней, от 4 дней до 6 дней или от 4 дней до 5 дней до генетической модификации. В некоторых вариантах осуществления клетки инкубируют в течение или в течение приблизительно 2 дней до модификации.

[0172] В некоторых вариантах осуществления клетки инкубируют с и/или в присутствии стимулирующего реагента до и/или во время генетической модификации клеток. В некоторых вариантах осуществления клетки инкубируют с и/или в присутствии стимулирующего реагента в течение периода времени от 12 часов до 36 часов, от 24 часов до 48 часов, от 24 часов до 72 часов, от 42 часов до 54 часов, от 60 часов до 120 часов, от 96 часов до 120 часов, от 90 часов, от 2 дней до 7 дней, от 3 дней до 8 дней, от 1 дня до 8 дней, от 4 дней до 6 дней или от 4 дней до 5 дней. В конкретных вариантах осуществления клетки культивируют, выращивают и/или инкубируют при стимулирующих условиях до и/или во время генетической модификации клеток в течение периода времени меньше 10 дней, 9 дней, 8 дней, 7 дней, 6 дней или 5 дней, 4 дней или в течение периода времени меньше 168 часов, 162 часов, 156 часов, 144 часов, 138 часов, 132 часов, 120 часов, 114 часов, 108 часов, 102 часов или 96 часов. В конкретных вариантах осуществления клетки инкубируют с и/или в присутствии стимулирующего реагента в течение или в течение приблизительно 4 дней, 5 дней, 6 дней или 7 дней. В некоторых вариантах осуществления



клетки инкубируют с и/или в присутствии стимулирующего реагента в течение или в течение приблизительно 4 дней. В конкретных вариантах осуществления клетки инкубируют с и/или в присутствии стимулирующего реагента в течение или в течение приблизительно 5 дней. В некоторых вариантах осуществления клетки инкубируют с и/или в присутствии стимулирующего реагента меньше 7 дней.

[0173] В некоторых вариантах осуществления инкубирование клеток при стимулирующих условиях включает инкубирование клеток со стимулирующим реагентом, описанным в Разделе I-B-1. В некоторых вариантах осуществления стимулирующий реагент содержит или включает сферу, такую как парамагнитная сфера, и клетки инкубируют со стимулирующим реагентом в отношении меньше 3:1 (сферы:клетки), таком как отношение 1:1. В конкретных вариантах осуществления клетки инкубируют со стимулирующим реагентом в присутствии одного или более цитокинов и/или одного или более антиоксидантов. В некоторых вариантах осуществления композицию обогащенных CD4<sup>+</sup> Т-клеток инкубируют со стимулирующим реагентом в отношении 1:1 (сферы:клетки) в присутствии рекомбинантного IL-2, IL-7, IL-15 и NAC. В некоторых вариантах осуществления композицию обогащенных CD8<sup>+</sup> Т-клеток инкубируют со стимулирующим реагентом в отношении 1:1 (сферы:клетки) в присутствии рекомбинантного IL-2, IL-15 и NAC. В некоторых вариантах осуществления стимулирующий реагент удаляют и/или отделяют от клеток через, в течение или в течение приблизительно 6 дней, 5 дней или 4 дней с начала или инициирования инкубирования, например, с момента, когда стимулирующий реагент добавляют или приводят в контакт с клетками.

### ***1. Стимулирующие реагенты***

[0174] В некоторых вариантах осуществления инкубирование композиции обогащенных клеток при стимулирующих условиях представляет собой или включает инкубирование и/или контакт композиции обогащенных клеток со стимулирующим реагентом, который способен вызывать активацию и/или размножение Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления стимулирующий реагент способен стимулировать и/или активировать один или более сигналов в клетках. В некоторых вариантах осуществления один или более сигналов опосредованы рецептором. В конкретных вариантах осуществления один или более сигналов являются или связаны с изменением сигнальной трансдукции и/или уровня или количества вторичных мессенджеров, например, цАМФ и/или внутриклеточного кальция, изменением количества, клеточной локализации, конформации, фосфорилирования, убиквитинилирования и/или усечением одного или более клеточных белков, и/или изменением клеточной активности, например, транскрипции, трансляции, деградации белка, клеточной морфологии, состояния активации и/или деления клеток. В конкретных вариантах осуществления стимулирующий реагент активирует и/или способен активировать один или более внутриклеточных сигнальных доменов одного или более компонентов комплекса TCR и/или одного или более внутриклеточных сигнальных доменов одной или более

костимулирующих молекул.

[0175] В некоторых вариантах осуществления стимулирующий реагент содержит частицу, например сферу, конъюгированную или связанную с одним или более средствами, например, биомолекулами, которые способны вызывать активацию и/или размножение клеток, например, Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления один или более средств связаны со сферой. В некоторых вариантах осуществления сфера является биосовместимой, т.е. состоит из материала, подходящего для биологического применения. В некоторых вариантах осуществления сферы являются нетоксичными для культивируемых клеток, например, культивируемых Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления сферы могут быть любыми частицами, к которым можно присоединять средства таким способом, который обеспечивает возможность взаимодействия между средством и клеткой.

[0176] В некоторых вариантах осуществления стимулирующий реагент содержит одно или более средств, которые способны вызывать активацию и/или размножение клеток, например, Т-клеток, которые связаны или иным образом соединены со сферой, например, с поверхностью сферы. В некоторых вариантах осуществления сфера является неклеточной частицей. В конкретных вариантах осуществления сфера может включать коллоидную частицу, микросферу, наночастицу, магнитную сферу и т.п. В некоторых вариантах осуществления сферы являются агарозными гранулами. В некоторых вариантах осуществления сферы являются сефарозными сферами.

[0177] В конкретных вариантах осуществления стимулирующий реагент содержит сферы, которые являются моодисперсными. В некоторых вариантах осуществления сферы, которые являются моодисперсными, включают дисперсии размера, имеющие стандартное отклонение диаметра меньше 5% друг от друга.

[0178] В некоторых вариантах осуществления сфера содержит одно или более средств, таких как средство, соединенное, конъюгированное или связанное (напрямую или непрямо) с поверхностью сферы. В некоторых вариантах осуществления средство, предусмотренное в настоящем документе, может включать, без ограничения перечисленными, РНК, ДНК, белки (например, ферменты), антигены, поликлональные антитела, моноклональные антитела, фрагменты антител, углеводы, липиды, лектины или любую другую биомолекулу с аффинностью к требуемой мишени. В некоторых вариантах осуществления требуемая мишень является Т-клеточным рецептором и/или компонентом Т-клеточного рецептора. В некоторых вариантах осуществления требуемой мишенью является CD3. В определенном варианте осуществления требуемой мишенью является Т-клеточная костимулирующая молекула, например, CD28, CD137 (4-1-BB), OX40 или ICOS. Одно или более средств могут быть присоединены напрямую или непрямо к сфере множеством способов, известных и доступных в уровне техники. Присоединение может быть ковалентным, нековалентным, электростатическим или гидрофобным и может быть выполнено множеством способов присоединения, в том числе, например, химическим способом, механическим способом или ферментным способом. В некоторых

вариантах осуществления биомолекула (например, биотинилированное антитело против CD3) может быть ненапрямую присоединена к сфере через другую биомолекулу (например, антитело против биотина), которая непосредственно присоединена к сфере.

[0179] В некоторых вариантах осуществления стимулирующий реагент содержит сферу и одно или более средств, которые непосредственно взаимодействуют с макромолекулой на поверхности клетки. В некоторых вариантах осуществления сфера (например, парамагнитная сфера) взаимодействуют с клеткой через одно или более средств (например, антитело), специфичных к одной или более макромолекулам на клетке (например, одному или более белкам клеточной поверхности). В некоторых вариантах осуществления сфера (например, парамагнитная сфера) помечена первым средством, описанным в настоящем документе, таким как первичное антитело (например, антитело против биотина), или другой биомолекулой, а затем добавляют второе средство, такое как вторичное антитело (например, биотинилированное антитело против CD3) или другую вторую биомолекулу (например, стрептавидин), в результате чего вторичное антитело или другая вторая биомолекула специфично связываются с такими первичными антителами или другой биомолекулой на частице.

[0180] В некоторых вариантах осуществления стимулирующий реагент содержит одно или более средств (например, антитело), которые присоединены к сфере (например, парамагнитной сфере) и специфично связываются с одной или более следующими макромолекулами на клетке (например, Т-клетке): CD2, CD3, CD4, CD5, CD8, CD25, CD27, CD28, CD29, CD31, CD44, CD45RA, CD45RO, CD54 (ICAM-1), CD127, МНСI, МНСII, СТLА-4, ICOS, PD-1, OX40, CD27L (CD70), 4-1BB (CD137), 4-1BBL, CD30L, СВЕТ, IL-2R, IL-12R, IL-1R, IL-15R; IFN-гаммаR, ФНО-альфаR, IL-4R, IL-10R, CD18/CD11a (LFA-1), CD62L (L-селектин), CD29/CD49d (VLA-4), Notch-лиганд (например, Дельта-подобный 1/4, Jagged 1/2 и т.д.), CCR1, CCR2, CCR3, CCR4, CCR5, CCR7 и CXCR3, или их фрагментом, включая соответствующие лиганды к этим макромолекулам или их фрагменты. В некоторых вариантах осуществления средство (например, антитело), присоединенное к сфере, специфично связывается с одним или более следующими макромолекулами на клетке (например, Т-клетке): CD28, CD62L, CCR7, CD27, CD127, CD3, CD4, CD8, CD45RA и/или CD45RO.

[0181] В некоторых вариантах осуществления одно или более средств, присоединенных к сфере, является антителом. Антитело может включать поликлональное антитело, моноклональное антитело (включая полноразмерные антитела, имеющие Fc-область иммуноглобулина), композиции антител с полиэпитопной специфичностью, мультиспецифичные антитела (например, биспецифичные антитела, диатела и одноцепочечные молекулы, а также фрагменты антител (например, Fab, F(ab')<sub>2</sub> и Fv). В некоторых вариантах осуществления стимулирующий реагент является фрагментом антитела (включая антигенсвязывающий фрагмент), например, Fab, Fab'-SH, Fv, scFv или (Fab')<sub>2</sub>-фрагмент. Следует понимать, что константные области любого изотипа могут использоваться для антител, предусмотренных в настоящем документе, включая

константные области IgG, IgM, IgA, IgD и IgE, и что такие константные области могут быть получены у человека или любого вида животных (например, виды мышинных). В некоторых вариантах осуществления средство является антителом, которое связывается с и/или распознает один или более компонентов T-клеточного рецептора. В конкретных вариантах осуществления средство является антителом против CD3. В некоторых вариантах осуществления средство является антителом, которое связывается с и/или распознает корецептор. В некоторых вариантах осуществления стимулирующий реагент включает антитело против CD28. В некоторых вариантах осуществления сфера имеет диаметр больше чем приблизительно 0,001 мкм, больше чем приблизительно 0,01 мкм, больше чем приблизительно 0,1 мкм, больше чем приблизительно 1,0 мкм, больше чем приблизительно 10 мкм, больше чем приблизительно 50 мкм, больше чем приблизительно 100 мкм или больше чем приблизительно 1000 мкм и не больше чем приблизительно 1500 мкм. В некоторых вариантах осуществления сфера имеет диаметр от приблизительно 1,0 мкм до приблизительно 500 мкм, от приблизительно 1,0 мкм до приблизительно 150 мкм, от приблизительно 1,0 мкм до приблизительно 30 мкм, от приблизительно 1,0 мкм до приблизительно 10 мкм, от приблизительно 1,0 мкм до приблизительно 5,0 мкм, от приблизительно 2,0 мкм до приблизительно 5,0 мкм или от приблизительно 3,0 мкм до приблизительно 5,0 мкм. В некоторых вариантах осуществления сфера имеет диаметр от приблизительно 3 мкм до приблизительно 5 мкм. В некоторых вариантах осуществления сфера имеет диаметр по меньшей мере или по меньшей мере приблизительно или приблизительно 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 некоторых вариантах осуществления сфера имеет диаметр 4,5 мкм или приблизительно 4,5 мкм. В некоторых вариантах осуществления сфера имеет диаметр 2,8 мкм или приблизительно 2,8 мкм.

[0182] В некоторых вариантах осуществления сферы имеют плотность больше чем  $0,001 \text{ г/см}^3$ , больше чем  $0,01 \text{ г/см}^3$ , больше чем  $0,05 \text{ г/см}^3$ , больше чем  $0,1 \text{ г/см}^3$ , больше чем  $0,5 \text{ г/см}^3$ , больше чем  $0,6 \text{ г/см}^3$ , больше чем  $0,7 \text{ г/см}^3$ , больше чем  $0,8 \text{ г/см}^3$ , больше чем  $0,9 \text{ г/см}^3$ , больше чем  $1 \text{ г/см}^3$ , больше чем  $1,1 \text{ г/см}^3$ , больше чем  $1,2 \text{ г/см}^3$ , больше чем  $1,3 \text{ г/см}^3$ , больше чем  $1,4 \text{ г/см}^3$ , больше чем  $1,5 \text{ г/см}^3$ , больше чем  $2 \text{ г/см}^3$ , больше чем  $3 \text{ г/см}^3$ , больше чем  $4 \text{ г/см}^3$  или больше чем  $5 \text{ г/см}^3$ . В некоторых вариантах осуществления сферы имеют плотность от приблизительно  $0,001 \text{ г/см}^3$  до приблизительно  $100 \text{ г/см}^3$ , от приблизительно  $0,01 \text{ г/см}^3$  до приблизительно  $50 \text{ г/см}^3$ , от приблизительно  $0,1 \text{ г/см}^3$  до приблизительно  $10 \text{ г/см}^3$ , от приблизительно  $0,1 \text{ г/см}^3$  до  $0,5 \text{ г/см}^3$ , от приблизительно  $0,5 \text{ г/см}^3$  до приблизительно  $1 \text{ г/см}^3$ , от приблизительно  $0,5 \text{ г/см}^3$  до приблизительно  $1,5 \text{ г/см}^3$ , от приблизительно  $1 \text{ г/см}^3$  до приблизительно  $1,5 \text{ г/см}^3$ , от приблизительно  $1 \text{ г/см}^3$  до приблизительно  $2 \text{ г/см}^3$  или от приблизительно  $1 \text{ г/см}^3$  до приблизительно  $5 \text{ г/см}^3$ . В некоторых вариантах осуществления сферы имеют плотность приблизительно  $0,5 \text{ г/см}^3$ , приблизительно  $0,5 \text{ г/см}^3$ , приблизительно  $0,6 \text{ г/см}^3$ , приблизительно  $0,7 \text{ г/см}^3$ ,

приблизительно  $0,8 \text{ г/см}^3$ , приблизительно  $0,9 \text{ г/см}^3$ , приблизительно  $1,0 \text{ г/см}^3$ , приблизительно  $1,1 \text{ г/см}^3$ , приблизительно  $1,2 \text{ г/см}^3$ , приблизительно  $1,3 \text{ г/см}^3$ , приблизительно  $1,4 \text{ г/см}^3$ , приблизительно  $1,5 \text{ г/см}^3$ , приблизительно  $1,6 \text{ г/см}^3$ , приблизительно  $1,7 \text{ г/см}^3$ , приблизительно  $1,8 \text{ г/см}^3$ , приблизительно  $1,9 \text{ г/см}^3$  или приблизительно  $2,0 \text{ г/см}^3$ . В некоторых вариантах осуществления сферы имеют плотность приблизительно  $1,6 \text{ г/см}^3$ . В конкретных вариантах осуществления, сферы или частицы имеют плотность приблизительно  $1,5 \text{ г/см}^3$ . В некоторых вариантах осуществления частицы имеют плотность приблизительно  $1,3 \text{ г/см}^3$ .

[0183] В некоторых вариантах осуществления множество сфер имеет однородную плотность. В некоторых вариантах осуществления однородная плотность включает допустимое отклонение плотности меньше 10%, меньше 5% или меньше 1% от средней плотности сфер.

[0184] В некоторых вариантах осуществления сферы имеют площадь поверхности от приблизительно  $0,001 \text{ м}^2$  на каждый грамм частиц ( $\text{м}^2/\text{г}$ ) до приблизительно  $1000 \text{ м}^2/\text{г}$ , от приблизительно  $0,010 \text{ м}^2/\text{г}$  до приблизительно  $100 \text{ м}^2/\text{г}$ , от приблизительно  $0,1 \text{ м}^2/\text{г}$  до приблизительно  $10 \text{ м}^2/\text{г}$ , от приблизительно  $0,1 \text{ м}^2/\text{г}$  до приблизительно  $1 \text{ м}^2/\text{г}$ , от приблизительно  $1 \text{ м}^2/\text{г}$  до приблизительно  $10 \text{ м}^2/\text{г}$ , от приблизительно  $10 \text{ м}^2/\text{г}$  до приблизительно  $100 \text{ м}^2/\text{г}$ , от приблизительно  $0,5 \text{ м}^2/\text{г}$  до приблизительно  $20 \text{ м}^2/\text{г}$ , от приблизительно  $0,5 \text{ м}^2/\text{г}$  до приблизительно  $5 \text{ м}^2/\text{г}$  или от приблизительно  $1 \text{ м}^2/\text{г}$  до приблизительно  $4 \text{ м}^2/\text{г}$ . В некоторых вариантах осуществления частицы или сферы имеют площадь поверхности от приблизительно  $1 \text{ м}^2/\text{г}$  до приблизительно  $4 \text{ м}^2/\text{г}$ .

[0185] В некоторых вариантах осуществления сфера содержит по меньшей мере один материал на или около поверхности сферы, который может быть связан, соединен или конъюгирован со средством. В некоторых вариантах осуществления сфера имеет функционализированную поверхность, т.е. включает функциональные группы, которые способны образовывать ковалентную связь со связывающей молекулой, например, полинуклеотидом или полипептидом. В конкретных вариантах осуществления сфера включает поверхностные карбоксильные, амина, гидроксильные, тозилльные, эпокси и/или хлорметильные группы. В конкретных вариантах осуществления сферы включают поверхностную агарозу и/или сефарозу. В некоторых вариантах осуществления поверхность сферы включает присоединенные стимулирующие реагенты, которые могут связывать или присоединять связывающие молекулы. В конкретных вариантах осуществления биомолекулы являются полипептидами. В некоторых вариантах осуществления сферы включают поверхностный белок А, белок G или биотин.

[0186] В некоторых вариантах осуществления сфера реагирует в магнитном поле. В некоторых вариантах осуществления сфера является магнитной сферой. В некоторых вариантах осуществления магнитная сфера является парамагнитной. В конкретных вариантах осуществления магнитная сфера является суперпарамагнитной. В некоторых вариантах осуществления сферы не проявляют магнитных свойств, если они не подвергнуты воздействию магнитного поля.

[0187] В конкретных вариантах осуществления сферы включают магнитное ядро, парамагнитное ядро или суперпарамагнитное ядро. В некоторых вариантах осуществления магнитное ядро содержит металл. В некоторых вариантах осуществления металлом может быть, без ограничения перечисленными, железо, никель, медь, кобальт, гадолиний, марганец, тантал, цинк, цирконий или их любые комбинации. В некоторых вариантах осуществления магнитное ядро включает оксиды металлов (например, оксиды железа), ферриты (например, ферриты марганца, ферриты кобальта, ферриты никеля и т.д.), гематит и сплавы металлов (например, CoTaZn). В некоторых вариантах осуществления магнитное ядро включает один или более из феррита, металла, металлического сплава, оксида железа или диоксида хрома. В некоторых вариантах осуществления магнитное ядро включает элементарное железо или его соединение. В некоторых вариантах осуществления магнитное ядро включает одно или более из магнетита ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ), маггемита ( $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$ ) или грейгита ( $\text{Fe}_3\text{S}_4$ ). В некоторых вариантах осуществления внутреннее ядро включает оксид железа (например,  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ).

[0188] В некоторых вариантах осуществления сфера содержит магнитное, парамагнитное и/или суперпарамагнитное ядро, покрытое функционализированной на поверхности оболочкой или покрытием. В некоторых вариантах осуществления оболочка может содержать материал, который может включать, без ограничения перечисленными, полимер, полисахарид, диоксид кремния, жирную кислоту, белок, углерод, агарозу, сефарозу или их комбинацию. В некоторых вариантах осуществления полимер может быть полиэтиленгликолем, сополимером молочной и гликолевой кислот, полиглутаральдегидом, полиуретаном, полистиролом или поливиниловым спиртом. В некоторых вариантах осуществления, внешняя оболочка или покрытие включает полистирол. В конкретных вариантах осуществления внешнее покрытие имеет функционализированную поверхность.

[0189] В некоторых вариантах осуществления стимулирующий реагент включает сферу, содержащую ядро из оксида металла (например, ядро из оксида железа) и оболочку, где ядро из оксида металла включает по меньшей мере один полисахарид (например, декстран), и где оболочка включает по меньшей мере один полисахарид (например, аминодекстран), по меньшей мере один полимер (например, полиуретан) и диоксид кремния. В некоторых вариантах осуществления ядро из оксида металла является ядром из коллоидного оксида железа. В некоторых вариантах осуществления одно или более средств включают антитело или его антигенсвязывающий фрагмент. В конкретных вариантах осуществления одно или более средств включают антитело против CD3 и антитело против CD28. В некоторых вариантах осуществления стимулирующий реагент включает антитело против CD3, антитело против CD28 и антитело против биотина. В некоторых вариантах осуществления стимулирующий реагент включает антитело против биотина. В некоторых вариантах осуществления сфера имеет диаметр от приблизительно 3 мкм до приблизительно 10 мкм. В некоторых вариантах осуществления сфера имеет диаметр от приблизительно 3 мкм до приблизительно 5 мкм. В некоторых вариантах

осуществления сфера имеет диаметр приблизительно 3,5 мкм.

[0190] В некоторых вариантах осуществления стимулирующий реагент включает одно или более средств, которые присоединены к сфере, включающей ядро из оксида металла (например, внутреннее ядро из оксида железа) и оболочку (например, защитную оболочку), где оболочка включает полистирол. В некоторых вариантах осуществления сферы являются монодисперсными парамагнитными (например, суперпарамагнитными) сферами, включающими парамагнитное (например, суперпарамагнитное) железное ядро, например, ядро, включающее магнетит ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) и/или маггемит ( $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$ ), и полистирольную оболочку или покрытие. В некоторых вариантах осуществления сфера не является пористой. В некоторых вариантах осуществления сферы имеют функционализированную поверхность, к которой присоединено одно или более средств. В некоторых вариантах осуществления одно или более средств ковалентно связаны со сферами на поверхности. В некоторых вариантах осуществления одно или более средств включают антитело или его антигенсвязывающий фрагмент. В некоторых вариантах осуществления одно или более средств включают антитело против CD3 и антитело против CD28. В некоторых вариантах осуществления стимулирующий реагент представляет собой или включает магнитные сферы против CD3/против CD28. В некоторых вариантах осуществления одно или более средств включают антитело против CD3 и/или антитело против CD28, при этом антитело или его антигенсвязывающий фрагмент способны связываться с меченым антителом (например, биотинилированным антителом), таким как меченое антитело против CD3 или против CD28. В некоторых вариантах осуществления сферы имеют плотность приблизительно  $1,5 \text{ г/см}^3$  и площадь поверхности от приблизительно  $1 \text{ м}^2/\text{г}$  до приблизительно  $4 \text{ м}^2/\text{г}$ . В конкретных вариантах осуществления сферы являются монодисперсными суперпарамагнитными сферами, имеющими диаметр приблизительно 4,5 мкм и плотность приблизительно  $1,5 \text{ г/см}^3$ . В некоторых вариантах осуществления сферы являются монодисперсными суперпарамагнитными сферами, имеющими средний диаметр приблизительно 2,8 мкм и плотность приблизительно  $1,3 \text{ г/см}^3$ .

[0191] В некоторых вариантах осуществления композицию обогащенных Т-клеток инкубируют со стимулирующим реагентом при отношении сфер к клеткам, составляющим или составляющим приблизительно 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 вариантах осуществления отношение сфер 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 до 0,9:1. В конкретных вариантах осуществления отношение стимулирующего реагента к клеткам составляет приблизительно 1:1 или 1:1.

## **2. Удаление стимулирующего реагента из клеток**

[0192] В некоторых вариантах осуществления стимулирующий реагент, например, магнитные сферы против CD3/против CD28, удаляют и/или отделяют от клеток. Без ограничения теорией, конкретные варианты предусматривают, что связывание и/или ассоциация между стимулирующим реагентом и клетками, в некоторых обстоятельствах,

может постепенно уменьшаться во время инкубирования. В некоторых вариантах осуществления одно или более средств могут быть добавлены для уменьшения связывания и/или ассоциации между стимулирующим реагентом и клетками. В конкретных вариантах осуществления изменение условий культивирования клеток, например температуры или рН среды, может уменьшить связывание и/или ассоциацию между стимулирующим реагентом и клетками. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления стимулирующий реагент может быть удален из инкубирования, системы культуры клеток и/или раствора отдельно от клеток, например, без удаления клеток из инкубирования, системы культуры клеток и/или также раствора.

[0193] Способы удаления стимулирующих реагентов (например, стимулирующих реагентов, которые представляют собой или содержат частицы, такие как сферические частицы или намагничиваемые частицы) из клеток известны. В некоторых вариантах осуществления могут использовать конкурирующие антитела, такие как немеченые антитела, которые, например, связываются с первичным антителом стимулирующего реагента и изменяют его аффинность к его антигену на клетке, позволяя, таким образом, производить мягкое отделение. В некоторых случаях после отделения конкурирующие антитела могут оставаться связанными с частицей (например, сферической частицей), тогда как непрореагировавшее антитело удаляют или могут удалять при промывке, при этом клетка освобождается от антитела, использовавшегося при выделении, отборе, обогащении и/или активации. Примером такого реагента является DETACaBEAD (Friedl et al. 1995; Entschladen et al. 1997). В некоторых вариантах осуществления частицы (например, сферические частицы) могут удалять в присутствии расщепляемого линкера (например, ДНК-линкера), в результате чего связанные с частицами антитела конъюгированы с линкером (например, CELlection, Dynal). В некоторых случаях линкерная область обеспечивает расщепляемый сайт для удаления частиц (например, сферических частиц) с клеток после выделения, например, при добавлении дезоксирибонуклеазы или другого высвобождающего буфера. В некоторых вариантах осуществления другие ферментные способы также могут использовать для высвобождения частицы (например, сферической частицы) с клеток. В некоторых вариантах осуществления частицы (например, сферические частицы или намагничиваемые частицы) являются биоразлагаемыми.

[0194] В некоторых вариантах осуществления стимулирующий реагент является магнитным, парамагнитным и/или суперпарамагнитным и/или содержит сферу, которая является магнитной, парамагнитной и/или суперпарамагнитной, и стимулирующий реагент может быть удален из клеток путем воздействия на клетки магнитного поля. Примеры подходящего оборудования, содержащего магниты для создания магнитного поля, включают DynaMag CTS (Thermo Fisher), Magnetic Separator (Takara) и EasySep Magnet (Stem Cell Technologies).

[0195] В конкретных вариантах осуществления стимулирующий реагент удаляют или отделяют от клеток до завершения предложенных способов, например, до сбора и/или



включения в состав модифицированных клеток, полученных способами, предложенными в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления стимулирующий реагент удаляют и/или отделяют от клеток до модификации, например трансдукции или трансфекции, клеток. В конкретных вариантах осуществления стимулирующий реагент удаляют и/или отделяют от клеток после этапа модификации клеток. В некоторых вариантах осуществления стимулирующий реагент удаляют до культивирования клеток, например, до культивирования модифицированных, например трансфицированных или трансдуцированных, клеток при условиях, вызывающих пролиферацию и/или экспансию.

[0196] В некоторых вариантах осуществления стимулирующий реагент отделяют и/или удаляют из клеток после некоторого промежутка времени. В конкретных вариантах осуществления промежуток времени представляет собой некоторое время от начала и/или инициирования инкубирования при стимулирующих условиях. В конкретных вариантах осуществления начало инкубирования предусмотрено в момент или приблизительно в момент, когда клетки подвергают контакту со стимулирующим реагентом и/или средой или раствором, содержащим стимулирующий реагент. В конкретных вариантах осуществления стимулирующий реагент удаляют или отделяют от клеток в течение или в течение приблизительно 10 дней, 9 дней, 8 дней, 7 дней, 6 дней, 5 дней, 4 дней, 3 дней или 2 дней после начала или инициирования инкубирования. В конкретных вариантах осуществления стимулирующий реагент удаляют и/или отделяют от клеток через или приблизительно через 9 дней, 8 дней, 7 дней, 6 дней, 5 дней, 4 дня, 3 дня или 2 дня после начала или инициирования инкубирования. В некоторых вариантах осуществления стимулирующий реагент удаляют и/или отделяют от клеток через или приблизительно через 168 часов, 162 часа, 156 часов, 144 часа, 138 часов, 132 часа, 120 часов, 114 часов, 108 часов, 102 часа или 96 часов после начала или инициирования инкубирования. В конкретных вариантах осуществления стимулирующий реагент удаляют и/или отделяют от клеток через или приблизительно через 5 дней после начала и/или инициирования инкубирования. В некоторых вариантах осуществления стимулирующий реагент удаляют и/или отделяют от клеток через или приблизительно через 4 дня после начала и/или инициирования инкубирования.

### **С. Модификация клеток**

[0197] В некоторых вариантах осуществления предложенные способы включают введение субъекту, имеющему заболевание или состояние, клеток, экспрессирующих рекомбинантный антигенный рецептор. Различные способы введения генетически модифицированных компонентов, например, рекомбинантных рецепторов, например, рецепторов CAR или TCR, известны и могут применяться с предложенными способами и композициями. Примеры способов включают способы переноса нуклеиновых кислот, кодирующих рецепторы, в том числе с помощью вирусных векторов, например, ретровирусных или лентивирусных, трансдукции, транспозонов и электропорации.

[0198] Клетки, экспрессирующие рецепторы и вводимые предложенными способами, включают модифицированные клетки. Генетическая модификация обычно

включает введение нуклеиновой кислоты, кодирующей рекомбинантный ген или сконструированный компонент, в композицию, содержащую клетки, например, путем ретровирусной трансдукции, трансфекции или трансформации.

[0199] В некоторых вариантах осуществления способы, предложенные в настоящем документе, применяются в отношении модификации одной или более композиций обогащенных Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления модификация представляет собой или включает введение полинуклеотида, например, рекомбинантного полинуклеотида, кодирующего рекомбинантный белок. В конкретных вариантах осуществления рекомбинантные белки являются рекомбинантными рецепторами, такими как любой из описанных в Разделе II. Введение молекул нуклеиновой кислоты, кодирующих рекомбинантный белок, такой как рекомбинантный рецептор, в клетку может быть выполнено с помощью любого из многих известных векторов. Такие векторы включают вирусные и невирусные системы, включая лентивирусные и гаммаретровирусные системы, а также системы на основе транспозонов, такие как системы переноса генов на основе PiggyBac или Sleeping Beauty. Примеры способов включают способы переноса нуклеиновых кислот, кодирующих рецепторы, в том числе с помощью вирусных векторов, например, ретровирусных или лентивирусных, трансдукции, транспозонов и электропорации. В некоторых вариантах осуществления в результате модификации получают одну или более модифицированных композиций обогащенных Т-клеток.

[0200] В некоторых вариантах осуществления одна или более композиций обогащенных Т-клеток модифицируют, например трансдуцируют или трансфицируют, перед культивированием клеток, например, при условиях, которые вызывают пролиферацию и/или размножение, например, способом, представленным в Разделе I-D. В конкретных вариантах осуществления одну или более композиций обогащенных Т-клеток модифицируют после стимуляции, активации и/или инкубирования одной или более композиций при стимулирующих условиях, как описано в способах, представленных в Разделе I.B. В конкретных вариантах осуществления одна или более композиций являются стимулированными композициями. В конкретных вариантах осуществления одна или более стимулированных композиций были предварительно подвергнуты криозаморозке и хранению и разморожены перед модификацией.

[0201] В некоторых вариантах осуществления одна или более композиций стимулированных Т-клеток представляют собой или включают две отдельных стимулированных композиции обогащенных Т-клеток. В конкретных вариантах осуществления две отдельных композиции обогащенных Т-клеток, например, две отдельных композиции обогащенных Т-клеток, отобранных, выделенных и/или обогащенных из одного и того же биологического образца, модифицируют отдельно. В некоторых вариантах осуществления две отдельных композиции включают композицию обогащенных CD4<sup>+</sup> Т-клеток. В конкретных вариантах осуществления две отдельных композиции включают композицию обогащенных CD8<sup>+</sup> Т-клеток. В некоторых вариантах

осуществления две отдельные композиции обогащенных CD4+ Т-клеток и обогащенных CD8+ Т-клеток, например, после инкубирования при стимулирующих условиях, как описано выше, генетически модифицируют отдельно. В некоторых вариантах осуществления одна композиция обогащенных Т-клеток является генетически модифицированной. В некоторых вариантах осуществления одна композиция является композицией обогащенных CD4+ Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления одна композиция является композицией обогащенных CD4+ и CD8+ Т-клеток, которые были объединены из отдельных композиций перед модификацией.

[0202] В некоторых вариантах осуществления композиции обогащенных CD4+ Т-клеток, таких как стимулированные CD4+ Т-клетки, которая является модифицированной, например трансдуцированной или трансфицированной, включает по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99%, по меньшей мере 99,5%, по меньшей мере 99,9% или 100% или приблизительно 100% CD4+ Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления композиции обогащенных CD4+ Т-клеток, таких как стимулированные CD4+ Т-клетки, которая является модифицированной, включает меньше 40%, меньше 35%, меньше 30%, меньше 25%, меньше 20%, меньше 15%, меньше 10%, меньше 5%, меньше 1%, меньше 0,1% или меньше 0,01% CD8+ Т-клеток, и/или не содержит CD8+ Т-клеток, и/или не содержит или по существу не содержит CD8+ Т-клеток.

[0203] В некоторых вариантах осуществления композиция обогащенных CD8+ Т-клеток, таких как стимулированные CD8+ Т-клетки, которая является модифицированной, например трансдуцированной или трансфицированной, включает по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99%, по меньшей мере 99,5%, по меньшей мере 99,9% или 100% или приблизительно 100% CD8+ Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления композиция обогащенных CD8+ Т-клеток, таких как стимулированные CD8+ Т-клетки, которая является модифицированной, включает меньше 40%, меньше 35%, меньше 30%, меньше 25%, меньше 20%, меньше 15%, меньше 10%, меньше 5%, меньше 1%, меньше 0,1% или меньше 0,01% CD4+ Т-клеток, и/или не содержит CD4+ Т-клеток, и/или не содержит или по существу не содержит CD4+ Т-клеток.

[0204] В некоторых вариантах осуществления отдельные композиции обогащенных CD4+ и CD8+ Т-клеток объединяют в одну композицию и генетически модифицируют, например, трансдуцируют или трансфицируют. В некоторых вариантах осуществления отдельные модифицированные композиции обогащенных CD4+ и обогащенных CD8+ Т-клеток объединяют в одну композицию после выполнения и/или завершения генетической модификации. В конкретных вариантах осуществления отдельные композиции обогащенных CD4+ и CD8+ Т-клеток, такие как отдельные композиции стимулированных CD4+ и CD8+ Т-клеток отдельно модифицируют и отдельно обрабатывают для

культивирования и/или размножения Т-клеток после выполнения и/или завершения генетической модификации.

[0205] В некоторых вариантах осуществления введение полинуклеотида, например, рекомбинантного полинуклеотида, кодирующего рекомбинантный белок, проводят путем контакта обогащенных CD4+ или CD8+ Т-клеток, таких как стимулированные CD4+ или CD8+ Т-клетки, с вирусными частицами, содержащими полинуклеотид. В некоторых вариантах осуществления контакт могут проводить при центрифугировании, например, путем спинокуляции (например, центрифужной инокуляции). В некоторых вариантах осуществления композицию, содержащую клетки, вирусные частицы и реагент, могут вращать, обычно при относительно низкой силе или скорости, такой как скорость ниже, чем скорость, обычно используемая для осаждения клеток, такая как от 600 об/мин до 1700 об/мин или от приблизительно 600 об/мин до приблизительно 1700 об/мин (например, составляющая или составляющая приблизительно или по меньшей мере 600 об/мин, 1000 об/мин или 1500 об/мин, или 1700 об/мин). В некоторых вариантах осуществления вращение производят с силой, например, относительным центробежным ускорением, от 100 g до 3200 g или от приблизительно 100 g до приблизительно 3200 g (например, составляющей или составляющей приблизительно или составляющей по меньшей мере или приблизительно 100 g, 200 g, 300 g, 400 g, 500 g, 1000 g, 1500 g, 2000 g, 2500 g, 3000 g или 3200 g), например, составляющей или составляющей приблизительно 693 g, при измерении, например, во внутренней или внешней стенке камеры или полости. Термин "относительное центробежное ускорение" или RCF обычно понимают как эффективную силу, сообщаемую объекту или веществу (такому как клетка, образец или осадок, и/или точка в камере или другом вращаемом контейнере) относительно силы тяжести земли, в конкретной точке в пространстве по сравнению с осью вращения. Значение может быть определено с использованием общеизвестных формул с учетом силы тяжести, скорости вращения и радиуса вращения (расстояния от оси вращения до объекта, вещества или частицы, на которой измеряют RCF). В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере, часть контакта, инкубирования и/или модификации клеток, например, клеток из стимулированной композиции обогащенных CD4+ Т-клеток или обогащенных CD8+ Т-клеток, вирусом проводят при вращении от приблизительно 100 g до 3200 g, от 1000 g до 2000 g, от 1000 g до 3200 g, от 500 g до 1000 g, от 400 g до 1200 g, от 600 g до 800 g, от 600 до 700 g или от 500 g до 700 g. В некоторых вариантах осуществления вращение производят при 600-700 g, например, при 693 g или приблизительно 693 g.

[0206] В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере часть модификации, трансдукции и/или трансфекции проводят при вращении, например, спинокуляции и/или центрифугировании. В некоторых вариантах осуществления вращение проводят в течение, в течение приблизительно или в течение по меньшей мере или приблизительно 5 минут, 10 минут, 15 минут, 30 минут, 60 минут, 90 минут, 1 часа, 2 часов, 3 часов, 4 часов, 6 часов, 8 часов, 12 часов, 24 часов, 48 часов, 72 часов, 2 дней, 3

дней, 4 дней, 5 дней, 6 дней или в течение по меньшей мере 7 дней. В некоторых вариантах осуществления вращение проводят в течение или в течение приблизительно 60 минут. В некоторых вариантах осуществления вращение проводят в течение приблизительно 30 минут. В некоторых вариантах осуществления вращение проводят в течение приблизительно 30 минут при 600-700 g, например, при 693 g или приблизительно 693 g.

[0207] В некоторых вариантах осуществления количество жизнеспособных клеток, подлежащих модификации, трансдукции и/или трансфекции изменяется в пределах от приблизительно  $5 \times 10^6$  клеток до приблизительно  $100 \times 10^7$  клеток, например, от приблизительно  $10 \times 10^6$  клеток до приблизительно  $100 \times 10^6$  клеток, от приблизительно  $100 \times 10^6$  клеток до приблизительно  $200 \times 10^6$  клеток, от приблизительно  $200 \times 10^6$  клеток до приблизительно  $300 \times 10^6$  клеток, от приблизительно  $300 \times 10^6$  клеток до приблизительно  $400 \times 10^6$  клеток, от приблизительно  $400 \times 10^6$  клеток до приблизительно  $500 \times 10^6$  клеток или от приблизительно  $500 \times 10^6$  клеток до приблизительно  $100 \times 10^7$  клеток. В конкретных примерах количество жизнеспособных клеток, подлежащих модификации, трансдукции и/или трансфекции, составляет приблизительно или меньше чем приблизительно  $300 \times 10^6$  клеток.

[0208] В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере часть модификации, трансдукции и/или трансфекции проводят в объеме (например, объеме спинокуляции) от приблизительно 5 мл до приблизительно 100 мл, таком как от приблизительно 10 мл до приблизительно 50 мл, от приблизительно 15 мл до приблизительно 45 мл, от приблизительно 20 мл до приблизительно 40 мл, от приблизительно 25 мл до приблизительно 35 мл или в 30 мл или приблизительно 30 мл. В некоторых вариантах осуществления объем осадка клеток после спинокуляции изменяется в пределах от приблизительно 1 мл до приблизительно 25 мл, например, от приблизительно 5 мл до приблизительно 20 мл, от приблизительно 5 мл до приблизительно 15 мл, от приблизительно 5 мл до приблизительно 10 мл или составляет 10 мл или приблизительно 10 мл.

[0209] В некоторых вариантах осуществления перенос генов осуществляют сначала путем стимуляции клетки, например, путем объединения ее со стимулом, который индуцирует ответ, такой как пролиферацию, выживание и/или активацию, например, измеряемый по экспрессии цитокина или маркера активации, с последующей трансдукцией активированных клеток и размножением в культуре до количества, достаточного для клинического применения. В некоторых вариантах осуществления перенос генов осуществляют сначала путем инкубирования клеток в стимулирующих условиях, таких как любой из способов, описанных в Разделе I-B.

[0210] В некоторых вариантах осуществления способы генетической модификации осуществляют путем контакта одной или более клеток композиции с молекулой нуклеиновой кислоты, кодирующей рекомбинантный белок, например, рекомбинантный рецептор. В некоторых вариантах осуществления контакт можно осуществлять при

центрифугировании, например, спинокуляции (например, центробежной инокуляции). Такие способы включают любые из способов, описанных в международной публикации WO2016/073602. Примерные центрифужные камеры включают камеры, выпускаемые и продаваемые Biosafe SA, включая камеры для применения с системами Serax® и Serax® 2, в том числе центробежные камеры A-200/F и A-200, а также различные наборы для применения с такими системами. Примеры камер, систем, а также технологического оборудования и шкафов описаны, например, в патенте США 6,125,555, патенте США 6,733,433 и опубликованной заявке на патент, публикации US 2008/0171951, а также опубликованной международной заявке, публикации WO 00/38762, содержание которых включено в настоящий документ посредством отсылки во всей их полноте. Примерные наборы для применения с такими системами включают, без ограничения перечисленными, одноразовые наборы, продаваемые BioSafe SA под торговыми наименованиями CS-430.1, CS-490.1, CS-600.1 или CS-900.2.

[0211] В некоторых вариантах осуществления система включена и/или помещена в сочетании с другим оборудованием, в том числе оборудованием для управления, автоматизации, контроля и/или мониторинга аспектов этапа трансдукции и одного или более других различных этапов обработки, выполняемых в системе, например, одного или более этапов обработки, которые могут проводить с помощью или в отношении системы центробежных камер, как описано в настоящем документе или в международной публикации WO2016/073602. Это оборудование в некоторых вариантах осуществления содержится внутри шкафа. В некоторых вариантах осуществления измерительная аппаратура включает в себя шкаф, который включает в себя корпус, содержащий блок управления, центрифугу, крышку, двигатели, насосы, датчики, дисплей и пользовательский интерфейс. Примерное устройство описано в патенте США 6,123,655, патенте США 6,733,433 и US 2008/0171951.

[0212] В некоторых вариантах осуществления система содержит ряд контейнеров, например, мешков, трубок, задвижек, зажимов, соединителей и центрифужную камеру. В некоторых вариантах осуществления контейнеры, такие как мешки, включают один или более контейнеров, таких как мешки, содержащие клетки, подлежащие трансдукции, и вирусные векторные частицы, в одном контейнере или отдельных контейнерах, таких как один и тот же мешок или отдельные мешки. В некоторых вариантах осуществления система дополнительно включает один или более контейнеров, таких как мешки, содержащие среду, такую как разбавитель и/или промывочный раствор, который поступает в камеру, и/или другие компоненты для разбавления, ресуспендирования и/или промывки компонентов и/или композиции во время осуществления способов. Контейнеры могут быть соединены в одном или нескольких положениях в системе, например, в положении, соответствующем впускной линии, линии разбавителя, линии промывки, линии сброса и/или выпускной линии.

[0213] В некоторых вариантах осуществления камера связана с центрифугой, которая способна осуществлять вращение камеры, например, вокруг ее оси вращения.

Вращение может происходить до, во время и/или после инкубирования в связи с трансдукцией клеток и/или в один или более других этапов обработки. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления один или более различных этапов обработки проводят при вращении, например, с конкретной силой. Камера обычно способна к вертикальному или в целом вертикальному вращению, при этом камера располагается вертикально во время центрифугирования, и боковая стенка и ось являются вертикальными или в целом вертикальными, причем торцевая стенка(и) расположена горизонтально или в целом горизонтально.

[0214] В некоторых вариантах осуществления композицию, содержащую клетки, и композицию, содержащую вирусные векторные частицы, и, необязательно, воздух могут объединять или смешивать перед помещением композиций в полость. В некоторых вариантах осуществления композицию, содержащую клетки, и композицию, содержащую вирусные векторные частицы, и, необязательно, воздух, помещают отдельно и объединяют и смешивают в полости. В некоторых вариантах осуществления композицию, содержащую клетки, композицию, содержащую вирусные векторные частицы, и, необязательно, воздух, могут помещать во внутреннюю полость в любом порядке. В любом из некоторых таких вариантов осуществления композиция, содержащая клетки и вирусные векторные частицы, является исходной композицией после объединения или смешивания, независимо от того, объединяют ли или смешивают такую композицию внутри или снаружи центрифужной камеры, и/или помещают ли клетки и вирусные векторные частицы в центрифужную камеру вместе или отдельно, например, одновременно или последовательно.

[0215] В некоторых вариантах осуществления ввод объема газа, такого как воздух, происходит перед инкубированием клеток и вирусных векторных частиц, например при вращении, в способе трансдукции. В некоторых вариантах осуществления ввод объема газа, такого как воздух, происходит во время инкубирования клеток и вирусных векторных частиц, например при вращении, в способе трансдукции.

[0216] В некоторых вариантах осуществления объем жидкой фазы клеток или вирусных векторных частиц, которые составляют композицию для трансдукции, и, необязательно, объем воздуха, может быть заданным объемом. Объем может быть объемом, который запрограммирован и/или регулируется электронной схемой, связанной с системой.

[0217] В некоторых вариантах осуществления ввод композиции для трансдукции и, необязательно, газа, такого как воздух, регулируют вручную, полуавтоматически и/или автоматически, пока требуемый или заданный объем не поступит во внутреннюю полость камеры. В некоторых вариантах осуществления датчик, связанный с системой, может обнаруживать жидкость и/или газ, текущие в камеру и из камеры центрифуги, например, по их цвету, скорости потока и/или плотности, и может взаимодействовать со связанной схемой, чтобы останавливать или продолжать ввод по мере необходимости, пока ввод такого требуемого или заданного объема не будет выполнен. В некоторых аспектах

датчик, который запрограммирован или способен обнаруживать в системе только жидкость, но не газ (например, воздух), может быть выполнен с возможностью пропускать газ, такой как воздух, в систему без остановки ввода. В некоторых таких вариантах осуществления непрозрачная трубка может быть помещена в линию около датчика, когда необходим ввод газа, такого как воздух. В некоторых вариантах осуществления ввода газа, такого как воздух, можно регулировать вручную.

[0218] В аспектах предложенных способов внутренняя полость камеры центрифуги подвергается высокоскоростному вращению. В некоторых вариантах осуществления вращение производят до, одновременно, после или периодически с вводом жидкой композиции и, необязательно, воздуха. В некоторых вариантах осуществления вращение производят после ввода жидкой композиции и, необязательно, воздуха. В некоторых вариантах осуществления вращение осуществляется при центрифугировании центрифужной камеры с относительным центробежным ускорением на внутренней поверхности боковой стенки внутренней полости и/или на поверхностном слое клеток, составляющим или составляющим приблизительно или по меньшей мере приблизительно 800 g, 1000 g, 1100 g, 1500 g, 1600 g, 1800 g, 2000 g, 2200 g, 2500 g, 3000 g, 3500 g или 4000 g. В некоторых вариантах осуществления вращение осуществляется при центрифугировании с силой, которая больше или приблизительно равна 1100 g, например, больше или приблизительно равна 1200 g, больше или приблизительно равна 1400 g, больше или приблизительно равна 1600 g, больше или приблизительно равна 1800 g, больше или приблизительно равна 2000 g, больше или приблизительно равна 2400 g, больше или приблизительно равна 2800 g, больше или приблизительно равна 3000 g или больше или приблизительно равна 3200 g. В некоторых вариантах осуществления вращение осуществляется при центрифугировании с силой, которая составляет или составляет приблизительно 1600 g.

[0219] В некоторых вариантах осуществления способ трансдукции включает вращение или центрифугирование композиции для трансдукции и, необязательно, воздуха в центрифужной камере в течение больше чем или приблизительно 5 минут, например, больше чем или приблизительно 10 минут, больше чем или приблизительно 15 минут, больше чем или приблизительно 20 минут, больше чем или приблизительно 30 минут, больше чем или приблизительно 45 минут, больше чем или приблизительно 60 минут, больше чем или приблизительно 90 минут или больше чем или приблизительно 120 минут. В некоторых вариантах осуществления композиция для трансдукции и, необязательно, воздух вращают или центрифугируют в центрифужной камере в течение больше чем 5 минут, но не больше 60 минут, не больше 45 минут, не больше 30 минут или не больше 15 минут. В конкретных вариантах осуществления трансдукция включает вращение или центрифугирование в течение или в течение приблизительно 60 минут.

[0220] В некоторых вариантах осуществления способ трансдукции включает вращение или центрифугирование композиции для трансдукции и, необязательно, воздуха в центрифужной камере в течение от или от приблизительно 10 минут до 60 минут, от 15



минут до 60 минут, от 15 минут до 45 минут, от 30 минут до 60 минут или от 45 минут до 60 минут, все включительно, и с силой на внутренней поверхности боковой стенки внутренней полости и/или на поверхностном слое клеток, составляющей по меньшей мере или больше чем или приблизительно 1000 g, 1100 g, 1200 g, 1400 g, 1500 g, 1600 g, 1800 g, 2000 g, 2200 g, 2400 g, 2800 g, 3200 g или 3600 g. В конкретных вариантах осуществления способ трансдукции включает вращение или центрифугирование композиции для трансдукции, например, клеток и вирусных векторных частиц, при 1600 g или приблизительно 1600 g в течение или в течение приблизительно 60 минут.

[0221] В некоторых вариантах осуществления газ, такой как воздух, в полости камеры удаляют из камеры. В некоторых вариантах осуществления газ, такой как воздух, удаляют в контейнер, который функционально связан в качестве части закрытой системы с центробежной камерой. В некоторых вариантах осуществления контейнер представляет собой свободный или пустой контейнер. В некоторых вариантах осуществления воздух, такой как газ, в полости камеры удаляют через фильтр, который функционально связан с внутренней полостью камеры через стерильную линию трубок. В некоторых вариантах осуществления воздух удаляют при использовании ручных, полуавтоматических или автоматических процессов. В некоторых вариантах осуществления воздух удаляют из камеры до, одновременно, периодически или после выпуска готовой композиции, содержащей инкубированные клетки и частицы вирусного вектора, такие как клетки, в которых была иницирована трансдукция, или клетки были трансдуцированы вирусным вектором, из полости камеры.

[0222] В некоторых вариантах осуществления трансдукцию и/или другое инкубирование проводят в качестве или в качестве части непрерывного или полунепрерывного процесса. В некоторых вариантах осуществления непрерывный процесс включает непрерывный ввод клеток и вирусных векторных частиц, например, композиции для трансдукции (в виде одной предварительно присутствующей композиции, либо путем непрерывной подачи в одну и ту же емкость, например, в полость, и, таким образом, с перемешиванием, ее части) и/или непрерывного выпуска или удаления жидкости и, при необходимости, удаления газа (например, воздуха) из сосуда в течение, по меньшей мере, части инкубирования, например, во время центрифугирования. В некоторых вариантах осуществления непрерывный ввод и непрерывный выпуск производят, по меньшей мере частично, одновременно. В некоторых вариантах осуществления непрерывный ввод происходит во время части инкубирования, например, во время части центрифугирования, и непрерывный выпуск происходит во время отдельной части инкубирования. Эти две операции могут чередоваться. Таким образом, непрерывный ввод и выпуск при проведении инкубирования может обеспечивать в целом больший объем образца для обработки, например, трансдукции.

[0223] В некоторых вариантах осуществления инкубирование является частью непрерывного процесса, где способ включает, во время, по меньшей мере, части инкубирования, выполнение непрерывного ввода указанной композиции для трансдукции

в полость при вращении камеры и во время части инкубирования, с выполнением непрерывного выпуска жидкости и, необязательно удаления газа (например, воздуха) из полости, по меньшей мере через одно отверстие, при вращении камеры.

[0224] В некоторых вариантах осуществления полунепрерывное инкубирование осуществляется путем чередования ввода композиции в полость, инкубирования, выпуска жидкости из полости и, необязательно, удаления газа (например, воздуха) из полости, например, в выпускной контейнер, а затем ввода последующей (например, второй, третьей и т.д.) композиции, содержащей дополнительное количество клеток и других реагентов для обработки, например, частиц вирусного вектора, и повтора процесса. Например, в некоторых вариантах осуществления инкубирование является частью полунепрерывного процесса, где способ включает, перед инкубированием, ввод композиции для трансдукции в полость через указанное по меньшей мере одно отверстие и, после инкубирования, осуществление выпуска жидкости из полости; выполнение ввода другой композиции для трансдукции, содержащей клетки и частицы вирусного вектора, в указанную внутреннюю полость; и инкубирование другой композиции для трансдукции в указанной внутренней полости при условиях, в которых указанные клетки в указанной другой композиции для трансдукции трансдуцируются указанным вектором. Процесс может быть продолжен итеративным способом в течение ряда дополнительных циклов. В этом отношении полунепрерывные или непрерывные способы могут обеспечить получение еще большего объема и/или количества клеток.

[0225] В некоторых вариантах осуществления часть инкубирования для трансдукции проводят в центрифужной камере при условиях, включающих вращение или центрифугирование.

[0226] В некоторых вариантах осуществления способ включает инкубирование, при котором дополнительную часть инкубирования клеток и вирусных векторных частиц проводят без вращения или центрифугирования, обычно после по меньшей мере части инкубирования, включающей вращение или центрифугирование камеры. В некоторых вариантах осуществления инкубирование клеток и вирусных векторных частиц проводят без вращения или центрифугирования в течение по меньшей мере 1 часа, 6 часов, 12 часов, 24 часов, 32 часов, 48 часов, 60 часов, 72 часов, 90 часов, 96 часов, 3 дней, 4 дней, 5 дней или больше 5 дней. В некоторых вариантах осуществления инкубирование проводят в течение или в течение приблизительно 72 часов.

[0227] В некоторых таких вариантах осуществления дополнительное инкубирование проводят при условиях, которые приводят к интеграции вирусного вектора в хозяйский геном одной или более клеток. Специалист в данной области сумеет оценить или определить, привело ли инкубирование к интеграции частиц вирусного вектора в хозяйский геном, и, следовательно, эмпирически определить условия для дополнительного инкубирования. В некоторых вариантах осуществления интеграция вирусного вектора в хозяйский геном может быть оценена при измерении уровня экспрессии рекомбинантного белка, такого как гетерологичный белок, кодируемый

нуклеиновой кислотой, содержащейся в геноме вирусной векторной частицы после инкубирования. Может использоваться ряд хорошо известных способов для оценки уровня экспрессии рекомбинантных молекул, таких как детектирование с помощью способов на основе аффинности, например, способов на основе иммуноаффинности, например, в отношении белков клеточной поверхности, таких как проточная цитометрия. В некоторых примерах экспрессию измеряют путем обнаружения маркера трансдукции и/или репортерной конструкции. В некоторых вариантах осуществления в вектор включают нуклеиновую кислоту, кодирующую усеченный поверхностный белок, и используют в качестве маркера его экспрессии и/или усиления.

[0228] В некоторых вариантах осуществления композицию, содержащую клетки, вектор, например вирусные частицы, и реагент, могут вращать, обычно с относительно низкой силой или скоростью, такой как скорость ниже, чем используемая для осаждения клеток, такая как от 600 об/мин до 1700 об/мин или от приблизительно 600 об/мин до приблизительно 1700 об/мин (например, составляющая или составляющая приблизительно или по меньшей мере 600 об/мин, 1000 об/мин или 1500 об/мин, или 1700 об/мин). В некоторых вариантах осуществления вращение производят с силой, например, относительным центробежным ускорением, от 100 g до 3200 g или от приблизительно 100 g до приблизительно 3200 g (например, составляющей или составляющей приблизительно или по меньшей мере приблизительно 100 g, 200 g, 300 g, 400 g, 500 g, 1000 g, 1500 g, 2000 g, 2500 g, 3000 g или 3200 g), при измерении, например, на внутренней или внешней стенке камеры или в полости. Термин "относительное центробежное ускорение" или RCF обычно понимают как эффективное ускорение, сообщаемое объекту или веществу (такому как клетка, образец или осадок, и/или точка в камере или другом вращаемом контейнере) относительно силы тяжести земли, в конкретной точке пространства по сравнению с осью вращения. Значение может быть определено при использовании известных формул с учетом силы тяжести, скорости вращения и радиуса вращения (расстояния от оси вращения до объекта, вещества или частицы, в которых измеряют RCF).

[0229] В некоторых вариантах осуществления, во время, по меньшей мере, части генетической модификации, например трансдукции, и/или после генетической модификации клетки переносят в модульный мешок биореактора для культуры генетически модифицированных клеток, например, для культивирования или размножения клеток, как описано выше.

[0230] В некоторых вариантах осуществления композицию обогащенных Т-клеток модифицируют, например трансдуцируют или трансфицируют, в присутствии вещества, способствующего трансдукции. В некоторых вариантах осуществления композицию обогащенных Т-клеток модифицируют в присутствии одного или более поликатионов. В некоторых вариантах осуществления композицию обогащенных Т-клеток модифицируют, например инкубируют, с вирусной векторной частицей в присутствии одного или более веществ, способствующих трансдукции. В конкретных вариантах осуществления композицию обогащенных Т-клеток трансфицируют, например инкубируют с невирусным

вектором, в присутствии одного или более веществ, способствующих трансдукции. В некоторых вариантах осуществления присутствие одного или более веществ, способствующих трансдукции, повышает эффективность трансгеноза, например, путем увеличения количества, части и/или процента клеток композиции, которые подвергаются модификации (например, трансдукции или трансфекции). В некоторых вариантах осуществления присутствие одного или более веществ, способствующих трансдукции, повышает эффективность трансфекции. В некоторых вариантах осуществления присутствие одного или более веществ, способствующих трансдукции, повышает эффективность трансдукции. В конкретных вариантах осуществления по меньшей мере 25%, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 99% клеток, модифицированных в присутствии поликатиона, содержат или экспрессируют рекомбинантный полинуклеотид. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере на 10%, по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 40%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 100%, по меньшей мере на 150%, по меньшей мере в 1 раз, по меньшей мере в 2 раза, по меньшей мере в 3 раза, по меньшей мере в 4 раза, по меньшей мере в 5 раз, по меньшей мере в 10 раз, по меньшей мере в 25 раз, по меньшей мере в 50 раз или по меньшей мере в 100 раз больше клеток композиции подвергаются модификации, в результате чего они содержат или экспрессируют рекомбинантные вещества, способствующие трансдукции, в присутствии поликатиона по сравнению с альтернативным и/или примерным способом модификации клеток без присутствия вещества, способствующего трансдукции.

[0231] В некоторых вариантах осуществления композицию обогащенных клеток модифицируют в присутствии меньше 100 мкг/мл, меньше 90 мкг/мл, меньше 80 мкг/мл, меньше 75 мкг/мл, меньше 70 мкг/мл, меньше 60 мкг/мл, меньше 50 мкг/мл, меньше 40 мкг/мл, меньше 30 мкг/мл, меньше 25 мкг/мл, меньше 20 мкг/мл или меньше мкг/мл, меньше 10 мкг/мл вещества, способствующего трансдукции. В некоторых вариантах осуществления вещества, способствующие трансдукции, подходящие для применения в соответствии с предложенными способами, включают, без ограничения перечисленными, поликатионы, фибронектин или полученные из фибронектина фрагменты или варианты, RetroNectin и их комбинации.

[0232] В некоторых вариантах осуществления клетки модифицируют в присутствии цитокина, например, рекомбинантного человеческого цитокина, в концентрации от 1 МЕ/мл до 1000 МЕ/мл, от 10 МЕ/мл и 50 МЕ/мл, от 50 МЕ/мл до 100 МЕ/мл, от 100 МЕ/мл до 200 МЕ/мл, от 100 МЕ/мл до 500 МЕ/мл, от 250 МЕ/мл до 500 МЕ/мл или от 500 МЕ/мл до 1000 МЕ/мл.

[0233] В некоторых вариантах осуществления композицию обогащенных Т-клеток

модифицируют в присутствии IL-2, например, человеческого рекомбинантного IL-2, в концентрации от 1 МЕ/мл до 200 МЕ/мл, от 10 МЕ/мл до 100 МЕ/мл, от 50 МЕ/мл до 150 МЕ/мл, от 80 МЕ/мл до 120 МЕ/мл, от 60 МЕ/мл до 90 МЕ/мл или от 70 МЕ/мл до 90 МЕ/мл. В конкретных вариантах осуществления, композицию обогащенных Т-клеток модифицируют в присутствии рекомбинантного IL-2 в концентрации, составляющей или составляющей приблизительно 50 МЕ/мл, 55 МЕ/мл, 60 МЕ/мл, 65 МЕ/мл, 70 МЕ/мл, 75 МЕ/мл, 80 МЕ/мл, 85 МЕ/мл, 90 МЕ/мл, 95 МЕ/мл, 100 МЕ/мл, 110 МЕ/мл, 120 МЕ/мл, 130 МЕ/мл, 140 МЕ/мл или 150 МЕ/мл. В некоторых вариантах осуществления композицию обогащенных Т-клеток модифицируют в присутствии 85 МЕ/мл или приблизительно 85 МЕ/мл. В некоторых вариантах осуществления популяция Т-клеток является популяцией CD4+ Т-клеток. В конкретных вариантах осуществления композиция обогащенных Т-клеток обогащена CD4+ Т-клетками, где композицию не обогащают CD8+ Т-клетками, и/или где CD8+ Т-клетки отрицательно отбирают или элиминируют из композиции. В конкретных вариантах осуществления композиция обогащенных Т-клеток является композицией обогащенных CD8+ Т-клеток. В конкретных вариантах осуществления композиция обогащенных Т-клеток обогащена CD8+ Т-клетками, где CD4+ Т-клетки не обогащают, и/или где CD4+ Т-клетки отрицательно отбирают или элиминируют из композиции.

[0234] В некоторых вариантах осуществления композицию обогащенных Т-клеток модифицируют в присутствии рекомбинантного IL-7, например, человеческого рекомбинантного IL-7, в концентрации от 100 МЕ/мл до 2000 МЕ/мл, от 500 МЕ/мл до 1000 МЕ/мл, от 100 МЕ/мл до 500 МЕ/мл, от 500 МЕ/мл до 750 МЕ/мл, от 750 МЕ/мл до 1000 МЕ/мл или от 550 МЕ/мл до 650 МЕ/мл. В конкретных вариантах осуществления композицию обогащенных Т-клеток модифицируют в присутствии IL-7 в концентрации, составляющей или составляющей приблизительно 50 МЕ/мл, 100 МЕ/мл, 150 МЕ/мл, 200 МЕ/мл, 250 МЕ/мл, 300 МЕ/мл, 350 МЕ/мл, 400 МЕ/мл, 450 МЕ/мл, 500 МЕ/мл, 550 МЕ/мл, 600 МЕ/мл, 650 МЕ/мл, 700 МЕ/мл, 750 МЕ/мл, 800 МЕ/мл, 750 МЕ/мл, 750 МЕ/мл, 750 МЕ/мл или 1000 МЕ/мл. В конкретных вариантах осуществления композицию обогащенных Т-клеток модифицируют в присутствии 600 МЕ/мл или приблизительно 600 МЕ/мл IL-7. В некоторых вариантах осуществления композицию, модифицированную в присутствии рекомбинантного IL-7, обогащают популяцией Т-клеток, например, CD4+ Т-клеток. В конкретных вариантах осуществления композицию обогащенных Т-клеток обогащают CD4+ Т-клетками, где композицию не обогащают CD8+ Т-клетками, и/или где CD8+ Т-клетки отрицательно отбирают или элиминируют из композиции.

[0235] В некоторых вариантах осуществления композиция обогащенных Т-клеток модифицируют в присутствии рекомбинантного IL-15, например, человеческого рекомбинантного IL-15, в концентрации от 0,1 МЕ/мл до 100 МЕ/мл, от 1 МЕ/мл до 50 МЕ/мл, от 5 МЕ/мл до 25 МЕ/мл, от 25 МЕ/мл до 50 МЕ/мл, от 5 МЕ/мл до 15 МЕ/мл или от 10 МЕ/мл до 100 МЕ/мл. В конкретных вариантах осуществления композицию обогащенных Т-клеток модифицируют в присутствии IL-15 в концентрации,

составляющей или составляющей приблизительно 1 МЕ/мл, 2 МЕ/мл, 3 МЕ/мл, 4 МЕ/мл, 5 МЕ/мл, 6 МЕ/мл, 7 МЕ/мл, 8 МЕ/мл, 9 МЕ/мл, 10 МЕ/мл, 11 МЕ/мл, 12 МЕ/мл, 13 МЕ/мл, 14 МЕ/мл, 15 МЕ/мл, 20 МЕ/мл, 25 МЕ/мл, 30 МЕ/мл, 40 МЕ/мл или 50 МЕ/мл. В некоторых вариантах осуществления композицию обогащенных Т-клеток модифицируют при 10 МЕ/мл или приблизительно 10 МЕ/мл ИЛ-15. В некоторых вариантах осуществления композицию обогащенных Т-клеток инкубируют при 10 МЕ/мл или приблизительно 10 МЕ/мл рекомбинантного ИЛ-15. В некоторых вариантах осуществления композицию, модифицированную в присутствии рекомбинантного ИЛ-15, обогащают популяцией Т-клеток, например, CD4+ Т-клеток и/или CD8+ Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления композиция обогащенных Т-клеток является композицией обогащенных CD8+ Т-клеток. В конкретных вариантах осуществления композицию обогащенных Т-клеток обогащают CD8+ Т-клетками, где композицию не обогащают CD4+ Т-клетками, и/или где CD4+ Т-клетки отрицательно отбирают или элиминируют из композиции. В некоторых вариантах осуществления композиция обогащенных Т-клеток является композицией обогащенных CD4+ Т-клеток. В конкретных вариантах осуществления композиция обогащенных Т-клеток обогащена CD4+ Т-клетками, где CD8+ Т-клетки не обогащают, и/или где CD8+ Т-клетки отрицательно отбирают или элиминируют из композиции.

[0236] В конкретных вариантах осуществления композиция обогащенных CD8+ Т-клеток модифицируют в присутствии ИЛ-2 и/или ИЛ-15. В некоторых вариантах осуществления композицию обогащенных CD4+ Т-клеток модифицируют в присутствии ИЛ-2, ИЛ-7 и/или ИЛ-15. В некоторых вариантах осуществления ИЛ-2, ИЛ-7 и/или ИЛ-15 являются рекомбинантными. В некоторых вариантах осуществления ИЛ-2, ИЛ-7 и/или ИЛ-15 являются человеческими. В конкретных вариантах осуществления один или более цитокинов представляют собой или включают человеческий рекомбинантный ИЛ-2, ИЛ-7 и/или ИЛ-15.

[0237] В конкретных вариантах осуществления клетки модифицируют в присутствии одного или более антиоксидантов. В некоторых вариантах осуществления антиоксиданты включают, без ограничения перечисленными, один или более антиоксидантов, включающих токоферол, токоτριенол, альфа-токоферол, бета-токоферол, гамма-токоферол, дельта-токоферол, альфа-токотриенол, бета-токотриенол, альфа-токоферолхинон, тролокс (6-гидрокси-2,5,7,8-тетраметилхроман-2-арбоновую кислоту), бутилгидроксианизол (ВНА), бутилгидрокситолуол (ВНТ), флавоноиды, изофлавоны, ликопин, бета-каротин, селен, убихинон, лютеин, S-аденозилметионин, глутатион, таурин, N-ацетилцистеин (НАС), лимонную кислоту, L-карнитин, ВНТ, монотиоглицерин, аскорбиновую кислоту, пропилгаллат, метионин, цистеин, гомоцистеин, глутатион, цистамин и цистатионин и/или глицин-глицин-гистидин.

[0238] В некоторых вариантах осуществления один или более антиоксидантов представляют собой или включают серосодержащий антиоксидант. В некоторых вариантах осуществления серосодержащий антиоксидант может включать

тиолсодержащие антиоксиданты и/или антиоксиданты, которые содержат один или более атомов серы, например, в кольцевой структуре. В некоторых вариантах осуществления серосодержащие антиоксиданты могут включать, например, N-ацетилцистеин (NAC) и 2,3-димеркаптопропанол (DMP), L-2-оксо-4-тиазолидинкарбоксилат (OTC) и липоевую кислоту. В конкретных вариантах осуществления серосодержащий антиоксидант является предшественником глутатиона. В некоторых вариантах осуществления предшественник глутатиона является молекулой, которая может быть модифицирована в одну или более стадий в клетке с получением производного глутатиона. В конкретных вариантах осуществления предшественник глутатиона может включать, без ограничения перечисленными, N-ацетилцистеин (NAC), L-2-оксотиазолидин-4-карбоновую кислоту (процистеин), липоевую кислоту, S-аллилцистеин или хлорид метилметионинсульфония.

[0239] В некоторых вариантах осуществления клетки модифицируют в присутствии одного или более антиоксидантов. В некоторых вариантах осуществления клетки модифицируют в присутствии от 1 нг/мл до 100 нг/мл, от 10 нг/мл до 1 мкг/мл, от 100 нг/мл до 10 мкг/мл, от 1 мкг/мл до 100 мкг/мл, от 10 мкг/мл до 1 мг/мл, от 100 мкг/мл до 1 мг/мл, от 1 500 мкг/мл до 2 мг/мл, 500 мкг/мл до 5 мг/мл, от 1 мг/мл до 10 мг/мл или от 1 мг/мл до 100 мг/мл одного или более антиоксидантов. В некоторых вариантах осуществления клетки модифицируют в присутствии одного или более антиоксиданта в количестве, равном или равном приблизительно 1 нг/мл, 10 нг/мл, 100 нг/мл, 1 мкг/мл, 10 мкг/мл, 100 мкг/мл, 0,2 мг/мл, 0,4 мг/мл, 0,6 мг/мл, 0,8 мг/мл, 1 мг/мл, 2 мг/мл, 3 мг/мл, 4 мг/мл, 5 мг/мл, 10 мг/мл, 20 мг/мл, 25 мг/мл, 50 мг/мл, 100 мг/мл, 200 мг/мл, 300 мг/мл, 400 мг/мл, 500 мг/мл. В некоторых вариантах осуществления один или более антиоксидантов представляют собой или включают серосодержащий антиоксидант. В конкретных вариантах осуществления один или более антиоксидантов представляют собой или включают предшественник глутатиона.

[0240] В некоторых вариантах осуществления клетки модифицируют в присутствии NAC. В некоторых вариантах осуществления клетки модифицируют в присутствии от 1 нг/мл до 100 нг/мл, от 10 нг/мл до 1 мкг/мл, от 100 нг/мл до 10 мкг/мл, от 1 мкг/мл до 100 мкг/мл, от 10 мкг/мл до 1 мг/мл, от 100 мкг/мл до 1 мг/мл, от 1500 мкг/мл до 2 мг/мл, от 500 мкг/мл до 5 мг/мл, от 1 мг/мл до 10 мг/мл или от 1 мг/мл до 100 мг/мл NAC. В некоторых вариантах осуществления клетки модифицируют в присутствии NAC в количестве, равном или равном приблизительно 1 нг/мл, 10 нг/мл, 100 нг/мл, 1 мкг/мл, 10 мкг/мл, 100 мкг/мл, 0,2 мг/мл, 0,4 мг/мл, 0,6 мг/мл, 0,8 мг/мл, 1 мг/мл, 2 мг/мл, 3 мг/мл, 4 мг/мл, 5 мг/мл, 10 мг/мл, 20 мг/мл, 25 мг/мл, 50 мг/мл, 100 мг/мл, 200 мг/мл, 300 мг/мл, 400 мг/мл, 500 мг/мл. В некоторых вариантах осуществления клетки модифицируют 0,8 мг/мл или приблизительно 0,8 мг/мл.

[0241] В некоторых вариантах осуществления композицию обогащенных Т-клеток, таких как стимулированные Т-клетки, например, стимулированные CD4+ Т-клетки или стимулированные CD8+ Т-клетки, модифицируют в присутствии одного или более поликатионов. В некоторых вариантах осуществления композицию обогащенных Т-

клеток, таких как стимулированные Т-клетки, например, стимулированные CD4+ Т-клетки или стимулированные CD8+ Т-клетки, трансдуцируют, например, инкубируют с вирусной векторной частицей, в присутствии одного или более поликатионов. В конкретных вариантах осуществления композицию обогащенных Т-клеток, такие как стимулированные Т-клетки, например, стимулированные CD4+ Т-клетки или стимулированные CD8+ Т-клетки, трансфицируют, например, инкубируют с невирусным вектором, в присутствии одного или более поликатионов. В некоторых вариантах осуществления присутствие одного или более поликатионов повышает эффективность трансгеноза, например, путем увеличения количества, части и/или процента клеток композиции, которые подвергаются модификации (например, трансдукции или трансфекции). В некоторых вариантах осуществления присутствие одного или более поликатионов повышает эффективность трансфекции. В некоторых вариантах осуществления присутствие одного или более поликатионов повышает эффективность трансдукции. В конкретных вариантах осуществления по меньшей мере 25%, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70% по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 99% клеток, модифицированных в присутствии поликатиона, содержат или экспрессируют рекомбинантный полинуклеотид. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере на 10%, по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 40%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 100%, по меньшей мере на 150%, по меньшей мере в 1 раз, по меньшей мере в 2 раза, по меньшей мере в 3 раза, по меньшей мере в 4 раза, по меньшей мере в 5 раз, по меньшей мере в 10 раз, по меньшей мере в 25 раз, по меньшей мере в 50 раз или по меньшей мере в 100 раз больше клеток композиции подвергаются модификации, в результате которой они содержат или экспрессируют рекомбинантный полинуклеотид, в присутствии поликатиона по сравнению с альтернативным и/или примерным способом модификации клеток без поликатиона.

[0242] В некоторых вариантах осуществления композицию обогащенных клеток, например, композицию обогащенных CD4+ Т-клеток или обогащенных CD8+ Т-клеток, таких как стимулированные Т-клетки, модифицируют в присутствии низкой концентрации или количества поликатиона, например, по сравнению с примерным и/или альтернативным способом модификации клеток в присутствии поликатиона. В некоторых вариантах осуществления композицию обогащенных клеток, таких как стимулированные Т-клетки, например, стимулированные CD4+ Т-клетки или стимулированные CD8+ Т-клетки, модифицируют в присутствии меньше чем 90%, меньше чем 80%, меньше чем 75%, меньше чем 70%, меньше чем 60%, меньше чем 50%, меньше чем 40%, меньше чем 30%, меньше чем 25%, меньше чем 20%, меньше чем 10%, меньше чем 5%, меньше чем 1%, меньше чем 0,1%, меньше чем 0,01% количества и/или концентрации поликатиона



примерного и/или альтернативного процесса модификации клеток. В некоторых вариантах осуществления композицию обогащенных клеток, таких как стимулированные Т-клетки, например, стимулированные CD4+ Т-клетки или стимулированные CD8+ Т-клетки, модифицируют в присутствии меньше чем 100 мкг/мл, меньше чем 90 мкг/мл, меньше чем 80 мкг/мл, меньше чем 75 мкг/мл, меньше чем 70 мкг/мл, меньше чем 60 мкг/мл, меньше чем 50 мкг/мл, меньше чем 40 мкг/мл, меньше чем 30 мкг/мл, меньше чем 25 мкг/мл, меньше чем 20 мкг/мл или меньше чем мкг/мл, меньше чем 10 мкг/мл поликатиона. В конкретных вариантах осуществления композицию обогащенных клеток, такие как стимулированные Т-клетки, например, стимулированные CD4+ Т-клетки или стимулированные CD8+ Т-клетки, модифицируют в присутствии поликатиона в количестве, равном или равном приблизительно 1 мкг/мл, 5 мкг/мл, 10 мкг/мл, 15 мкг/мл, 20 мкг/мл, 25 мкг/мл, 30 мкг/мл, 35 мкг/мл, 40 мкг/мл, 45 мкг/мл или 50 мкг/мл.

[0243] В конкретных вариантах осуществления модификация композиции обогащенных клеток, таких как стимулированные Т-клетки, например, стимулированные CD4+ Т-клетки или стимулированные CD8+ Т-клетки, в присутствии поликатиона уменьшает количество погибших клеток, например, в результате некроза, программируемой гибели клеток или апоптоза. В некоторых вариантах осуществления композицию обогащенных Т-клеток, таких как стимулированные Т-клетки, например, стимулированные CD4+ Т-клетки или стимулированные CD8+ Т-клетки, модифицируют в присутствии низкого количества поликатиона, например, меньше чем 100 мкг/мл, 50 мкг/мл или 10 мкг/мл, при этом остается по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 99% или по меньшей мере 99,9% живых клеток, например, не подвергшихся некрозу, программируемой гибели клеток или апоптозу, в течение или по меньшей мере через 1 день, 2 дня, 3 дня, 4 дня, 5 дней, 6 дней, 7 дней или больше 7 дней после завершения этапа модификации. В некоторых вариантах осуществления композицию модифицируют в присутствии низкой концентрации или количества поликатиона по сравнению с альтернативным и/или примерным способом модификации клеток в присутствии более высокого количества или концентрации поликатиона, например, больше чем 50 мкг/мл, 100 мкг/мл, 500 мкг/мл или 1000 мкг/мл, при этом клетки композиции демонстрируют по меньшей мере на 10%, по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 40%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 100%, по меньшей мере на 150%, по меньшей мере в 1 раз, по меньшей мере в 2 раза, по меньшей мере в 3 раза, по меньшей мере в 4 раза, по меньшей мере в 5 раз, по меньшей мере в 10 раз, по меньшей мере в 25 раз, по меньшей мере в 50 раз или по меньшей мере в 100 раз большее выживание по сравнению с клетками, подвергнутыми примерному и/или альтернативному процессу.

[0244] В некоторых вариантах осуществления поликатион положительно заряжен.

В некоторых вариантах осуществления поликатион уменьшает силы отталкивания между клетками и векторами, например, вирусными или невирусными векторами, и опосредует контакт и/или связывание вектора с поверхностью клеток. В некоторых вариантах осуществления поликатион представляет собой полибрен, DEAE-декстран, протамина сульфат, поли-L-лизин или катионные липосомы.

[0245] В конкретных вариантах осуществления поликатионом является протамина сульфат. В некоторых вариантах осуществления композицию обогащенных Т-клеток, таких как стимулированные Т-клетки, например, стимулированные CD4<sup>+</sup> Т-клетки или стимулированные CD8<sup>+</sup> Т-клетки, модифицируют в присутствии меньше чем или приблизительно 500 мкг/мл, меньше чем или приблизительно 400 мкг/мл, меньше чем или приблизительно 300 мкг/мл, меньше чем или приблизительно 200 мкг/мл, меньше чем или приблизительно 150 мкг/мл, меньше чем или приблизительно 100 мкг/мл, меньше чем или приблизительно 90 мкг/мл, меньше чем или приблизительно 80 мкг/мл, меньше чем или приблизительно 75 мкг/мл, меньше чем или приблизительно 70 мкг/мл, меньше чем или приблизительно 60 мкг/мл, меньше чем или приблизительно 50 мкг/мл, меньше чем или приблизительно 40 мкг/мл, меньше чем или приблизительно 30 мкг/мл, меньше чем или приблизительно 25 мкг/мл, меньше чем или приблизительно 20 мкг/мл или меньше чем или приблизительно 15 мкг/мл, или меньше чем или приблизительно 10 мкг/мл протамина сульфата. В конкретных вариантах осуществления композицию обогащенных клеток, такие как стимулированные Т-клетки, например, стимулированные CD4<sup>+</sup> Т-клетки или стимулированные CD8<sup>+</sup> Т-клетки, модифицируют в присутствии протамина сульфата в количестве, равном или равном приблизительно 1 мкг/мл, 5 мкг/мл, 10 мкг/мл, 15 мкг/мл, 20 мкг/мл, 25 мкг/мл, 30 мкг/мл, 35 мкг/мл, 40 мкг/мл, 45 мкг/мл, 50 мкг/мл, 55 мкг/мл, 60 мкг/мл, 75 мкг/мл, 80 мкг/мл, 85 мкг/мл, 90 мкг/мл, 95 мкг/мл, 100 мкг/мл, 105 мкг/мл, 110 мкг/мл, 115 мкг/мл, 120 мкг/мл, 125 мкг/мл, 130 мкг/мл, 135 мкг/мл, 140 мкг/мл, 145 мкг/мл или 150 мкг/мл.

[0246] В некоторых вариантах осуществления модифицированная композиция обогащенных CD4<sup>+</sup> Т-клеток, такие как стимулированные Т-клетки, например, стимулированные CD4<sup>+</sup> Т-клетки, включает по меньшей мере 40%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99%, по меньшей мере 99,5%, по меньшей мере 99,9% или 100% или приблизительно 100% CD4<sup>+</sup> Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления композиция обогащенных CD4<sup>+</sup> Т-клеток, таких как стимулированные Т-клетки, например, стимулированные CD4<sup>+</sup> Т-клетки, которая модифицирована, включает меньше 40%, меньше 35%, меньше 30%, меньше 25%, меньше 20%, меньше 15%, меньше 10%, меньше 5%, меньше 1%, меньше 0,1% или меньше 0,01% CD8<sup>+</sup> Т-клеток, и/или не содержит CD8<sup>+</sup> Т-клеток, и/или не содержит или по существу не содержит CD8<sup>+</sup> Т-клеток.

[0247] В некоторых вариантах осуществления композиция обогащенных CD8<sup>+</sup> Т-

клеток, таких как стимулированные Т-клетки, например, стимулированные CD8+ Т-клетки, которая модифицирована, включает по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99%, по меньшей мере 99,5%, по меньшей мере 99,9% или 100% или приблизительно 100% CD8+ Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления композиция обогащенных CD8+ Т-клеток, таких как стимулированные Т-клетки, например, стимулированные CD8+ Т-клетки, которая модифицирована, включает меньше 40%, меньше 35%, меньше 30%, меньше 25%, меньше 20%, меньше 15%, меньше 10%, меньше 5%, меньше 1%, меньше 0,1% или меньше 0,01% CD4+ Т-клеток, и/или не содержит CD4+ Т-клеток, и/или не содержит или по существу не содержит CD4+ Т-клеток.

[0248] В некоторых вариантах осуществления модификация клеток включает культивирование, контакт или инкубирование с вектором, например, вирусным вектором или невирусным вектором. В некоторых вариантах осуществления модификация включает культивирование, контакт и/или инкубирование клеток с вектором в течение, в течение приблизительно или в течение по меньшей мере 4 часов, 6 часов, 8 часов, 12 часов, 16 часов, 18 часов, 24 часов, 30 часов, 36 часов, 40 часов, 48 часов, 54 часов, 60 часов, 72 часов, 84 часов, 1 дня, 2 дней, 3 дней, 4 дней, 5 дней, 6 дней или 7 дней или больше 7 дней. В конкретных вариантах осуществления модификация включает культивирование, контакт и/или инкубирование клеток с вектором в течение или в течение приблизительно 24 часов, 36 часов, 48 часов, 60 часов, 72 часов или 84 часов, или в течение или в течение приблизительно 2 дней, 3 дней, 4 дней или 5 дней. В некоторых вариантах осуществления этап модификации проводят в течение или в течение приблизительно 24 часов, 36 часов, 48 часов, 60 часов, 72 часов или 84 часов. В некоторых вариантах осуществления модификацию проводят в течение приблизительно 60 часов или приблизительно 84 часов, в течение или в течение приблизительно 72 часов, или в течение или в течение приблизительно 2 дней.

[0249] В некоторых вариантах осуществления модификацию проводят при температуре от приблизительно 25 до приблизительно 38°C, такой как от приблизительно 30 до приблизительно 37°C, от приблизительно 36 до приблизительно 38°C или при  $37\pm 2^\circ\text{C}$  или приблизительно  $37\pm 2^\circ\text{C}$ . В некоторых вариантах осуществления композицию обогащенных Т-клеток модифицируют при содержании CO<sub>2</sub> от приблизительно 2,5% до приблизительно 7,5%, таком как от приблизительно 4% до приблизительно 6%, например, при  $5\pm 0,5\%$  или приблизительно  $5\pm 0,5\%$ . В некоторых вариантах осуществления композицию обогащенных Т-клеток модифицируют при температуре 37°C или приблизительно 37°C и/или при содержании CO<sub>2</sub> 5% или приблизительно 5%.

[0250] В некоторых вариантах осуществления клетки, например, CD4+ и/или CD8+ Т-клетки, культивируют после проведения одного или более этапов генетической модификации, например, трансдукции или трансфекции клеток, в результате чего они содержат полинуклеотид, кодирующий рекомбинантный рецептор. В некоторых

вариантах осуществления культивирование может включать культивирование, инкубирование, стимуляцию, активацию, экспансию и/или размножение. В некоторых таких вариантах осуществления дополнительное культивирование проводят в условиях для интеграции вирусного вектора в хозяйский геном одной или более клеток. Инкубирование и/или модификация могут быть выполнены в культуральном сосуде, таком как блок, камера, лунка, колонка, пробирка, трубка, набор трубок, клапан, флакон, чашка для культивирования, мешок или другой контейнер для культуры или культивирования клеток. В некоторых вариантах осуществления композиции или клетки инкубируют в присутствии стимулирующих условий или стимулирующего средства. Такие условия включают условия, подобранные, чтобы обеспечить пролиферацию, размножение, активацию и/или выживание клеток в популяции, имитировать контакт с антигеном и/или примировать клетки для генетической модификации, например, для введения рекомбинантного антигенного рецептора.

[0251] В некоторых вариантах осуществления дополнительное инкубирование проводят при температурах выше комнатной температуры, таких как выше или выше чем приблизительно  $25^{\circ}\text{C}$ , таких как выше или выше чем приблизительно  $32^{\circ}\text{C}$ ,  $35^{\circ}\text{C}$  или  $37^{\circ}\text{C}$ . В некоторых вариантах осуществления дополнительное инкубирование проводят при температуре  $37\pm 2^{\circ}\text{C}$  или приблизительно  $37\pm 2^{\circ}\text{C}$ , например, при температуре  $37^{\circ}\text{C}$  или приблизительно  $37^{\circ}\text{C}$ .

[0252] В некоторых вариантах осуществления дополнительное инкубирование проводят в условиях для стимуляции и/или активации клеток, которые могут включать одну или более конкретных сред, температуру, содержание кислорода, содержание углекислого газа, время, вещества, например, питательные вещества, аминокислоты, антибиотики, ионы и/или стимулирующие факторы, такие как цитокины, хемокины, антигены, партнеры по связыванию, слитые белки, рекомбинантные растворимые рецепторы и любые другие вещества, разработанные для активации клеток.

[0253] В некоторых вариантах осуществления стимулирующие условия или средства включают одно или более средств (например, стимулирующих и/или дополнительных средств), например, лиганд, который способен вызывать активацию внутриклеточного сигнального домена комплекса TCR. В некоторых аспектах средство активирует или инициирует внутриклеточный сигнальный каскад TCR/CD3 в Т-клетке, например, средства, подходящие для передачи первичного сигнала, например, для инициации активации ИТАМ-индуцированного сигнала, такие как средства, специфичные к компоненту TCR, и/или средство, которое индуцирует костимулирующий сигнал, такой как средство, специфичное к Т-клеточному костимулирующему рецептору, например, против CD3, против CD28 или против 41-BB, например, необязательно связанное с твердой подложкой, такой как сфера, и/или один или более цитокинов. Стимулирующие средства включают сферы против CD3/против CD28 (например, сферы DYNABEADS® M-450 CD3/CD28 T Cell Expander и/или ExpACT®). Необязательно способ размножения может дополнительно включать этап добавления антитела против CD3 и/или против CD28

в среду культивирования. В некоторых вариантах осуществления стимулирующие средства включают IL-2 и/или IL-15, например, концентрацию IL-2 по меньшей мере приблизительно 10 единиц/мл.

[0254] В некоторых вариантах осуществления стимулирующие условия или средства включают одно или более средств, например, лиганд, который способен вызывать активацию внутриклеточного сигнального домена комплекса TCR. В некоторых аспектах средство включает или инициирует внутриклеточный сигнальный каскад TCR/CD3 в Т-клетке. Такие средства могут включать антитела, например, специфичные к компоненту TCR и/или костимулирующего рецептора, например, против CD3, против CD28, например, связанные с твердой подложкой, такой как сфера, и/или один или более цитокинов. Необязательно способ размножения может дополнительно включать этап добавления антитела против CD3 и/или против CD28 в среду культивирования (например, в концентрации по меньшей мере приблизительно 0,5 нг/мл). В некоторых вариантах осуществления стимулирующие средства включают IL-2 и/или IL-15, например, концентрацию IL-2 по меньшей мере приблизительно 10 единиц/мл, по меньшей мере приблизительно 50 единиц/мл, по меньшей мере приблизительно 100 единиц/мл или по меньшей мере приблизительно 200 единиц/мл.

[0255] Условия могут включать одну или более конкретных сред, температуру, содержание кислорода, содержание углекислого газа, время, вещества, например, питательные вещества, аминокислоты, антибиотики, ионы и/или стимулирующие факторы, такие как цитокины, хемокины, антигены, партнеры по связыванию, слитые белки, рекомбинантные растворимые рецепторы и любые другие вещества, разработанные для активации клеток.

[0256] В некоторых аспектах инкубирование проводят в соответствии с методами, такими как описанные в патенте США 6,040,177 (Riddell et al.), Klebanoff et al.(2012) J Immunother. 35(9):651-660, Terakura et al. (2012) Blood 1:72-82, и/или Wang et al. (2012) J Immunother. 35(9):689-701.

[0257] В некоторых вариантах осуществления дополнительное инкубирование проводят в том же контейнере или аппарате, в котором происходил контакт. В некоторых вариантах осуществления дополнительное инкубирование проводят без вращения или центрифугирования, которое обычно проводят после, по меньшей мере, части инкубирования, выполняемого при вращении, например, в сочетании с центрифугированием или спинокуляцией. В некоторых вариантах осуществления дополнительное инкубирование проводят вне стационарной фазы, например, вне хроматографической матрицы, например, в растворе.

[0258] В некоторых вариантах осуществления дополнительное инкубирование проводят в другом контейнере или аппарате, отличающемся от того, в котором происходил контакт, например, при переносе, например автоматическом переносе, композиции клеток в другой контейнер или аппарат после контакта с вирусными частицами и реагентом.

[0259] В некоторых вариантах осуществления дополнительное культивирование или инкубирование, например, для стимуляции экспансии *ex vivo*, проводят в течение больше чем или больше чем приблизительно 24 часов, 2 дней, 3 дней, 4 дней, 5 дней, 6 дней, 7 дней, 8 дней, 9 дней, 10 дней, 11 дней, 12 дней, 13 дней или 14 дней. В некоторых вариантах осуществления дополнительное культивирование или инкубирование проводят в течение не больше чем 6 дней, не больше чем 5 дней, не больше чем 4 дней, не больше чем 3 дней, не больше чем 2 дней или не больше чем 24 часов.

[0260] В некоторых вариантах осуществления общая продолжительность инкубирования, например, со стимулирующим средством, составляет от или от приблизительно 1 часа до 96 часов, от 1 часа до 72 часов, от 1 часа до 48 часов, от 4 часов до 36 часов, от 8 часов до 30 часов или от 12 часов до 24 часов, например, по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере или приблизительно 6 часов, 12 часов, 18 часов, 24 часа, 36 часов или 72 часа. В некоторых вариантах осуществления дополнительное инкубирование осуществляют в течение некоторого времени от или от приблизительно 1 часа до 48 часов, от 4 часа до 36 часов, от 8 часов до 30 часов или от 12 часов до 24 часов, включительно.

[0261] В некоторых вариантах осуществления способы, предложенные в настоящем документе, не включают дополнительное культивирование или инкубирование, например, не включают этап экспансии *ex vivo* или включают существенно более короткий этап экспансии *ex vivo*.

[0262] В некоторых вариантах осуществления стимулирующий реагент удаляют и/или отделяют от клеток до модификации. В конкретных вариантах осуществления стимулирующий реагент удаляют и/или отделяют от клеток после модификации. В некоторых вариантах осуществления стимулирующее средство удаляют и/или отделяют от клеток после модификации и до культивирования модифицированных клеток, например, при условиях, которые вызывают пролиферацию и/или размножение. В некоторых вариантах осуществления стимулирующий реагент является стимулирующим реагентом, описанным в Разделе I-B-1. В конкретных вариантах осуществления стимулирующий реагент удаляют и/или отделяют от клеток, как описано в Разделе I-B-2.

### ***1. Векторы и способы***

[0263] Также предложены один или более полинуклеотидов (например, молекул нуклеиновой кислоты), кодирующих рекомбинантные рецепторы, векторы для генетической модификации клеток с целью экспрессии таких рецепторов в соответствии с предложенными способами для получения модифицированных клеток. В некоторых вариантах осуществления вектор содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую рекомбинантный рецептор. В конкретных вариантах осуществления вектор является вирусным вектором или невирусным вектором. В некоторых случаях вектор является вирусным вектором, таким как ретровирусный вектор, например, лентивирусный вектор или гаммаретровирусный вектор.

[0264] В некоторых случаях последовательность нуклеиновой кислоты,

кодирующей рекомбинантный рецептор, например, химерный антигенный рецептор (CAR), содержит сигнальную последовательность, кодирующую сигнальный пептид. Неограничивающие иллюстративные примеры сигнальных пептидов включают, например, сигнальный пептид альфа-цепи GMCSFR, представленный в SEQ ID NO: 61 и кодируемый нуклеотидной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 60, сигнальный пептид CD8-альфа, представленный в SEQ ID NO: 59, или сигнальный пептид CD33, представленный в SEQ ID NO: 58.

[0265] В некоторых вариантах осуществления векторы включают вирусные векторы, например, ретровирусные или лентивирусные, невирусные векторы или транспозоны, например, систему транспозона Sleeping Beauty, векторы, полученные из вируса обезьян 40 (SV40), аденовирусы, аденоассоциированный вирус (AAV), лентивирусные векторы или ретровирусные векторы, такие как гаммаретровирусные векторы, ретровирусный вектор, полученный из вируса лейкоза мышей Молони (MoMLV), вирус миелопролиферативной саркомы (MPSV), вирус мышинных эмбриональных стволовых клеток (MESV), вирус мышинных стволовых клеток (MSCV), фокус-формирующий вирус некроза селезенки (SFFV) или аденоассоциированный вирус (AAV).

[0266] В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор или невирусная ДНК содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую гетерологичный рекомбинантный белок. В некоторых вариантах осуществления гетерологичная рекомбинантная молекула представляет собой или включает рекомбинантный рецептор, например, антигенный рецептор, SB-транспозоны, например, для сайленсинга гена, содержащиеся в капсидах транспозоны, гомологичную двухцепочечную нуклеиновую кислоту, например, для геномной рекомбинации, или репортерные гены (например, флуоресцентные белки, такие как GFP или люцифераза).

*а. Вирусные векторные частицы*

[0267] В некоторых вариантах осуществления рекомбинантные нуклеиновые кислоты переносят в клетки при использовании рекомбинантных инфекционных вирусных частиц, таких как, например, векторы, полученные из вируса обезьян 40 (SV40), аденовирусов, аденоассоциированного вируса (AAV). В некоторых вариантах осуществления рекомбинантные нуклеиновые кислоты переносят в Т-клетки при использовании рекомбинантных лентивирусных векторов или ретровирусных векторов, таких как гаммаретровирусные 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).

[0268] В некоторых вариантах осуществления ретровирусный вектор содержит последовательность длинного концевой повтора (LTR), например, ретровирусный вектор, полученный из вируса лейкоза мышей Молони (MoMLV), вируса миелопролиферативной саркомы (MPSV), вируса мышинных эмбриональных стволовых клеток (MESV), вируса

мышинных стволовых клеток (MSCV), фокус-формирующего вируса некроза селезенки (SFFV) или аденоассоциированного вируса (AAV). Большинство ретровирусных векторов получают из мышинных ретровирусов. В некоторых вариантах осуществления ретровирусы включают вирусы, полученные из любой клетки птицы или млекопитающего в качестве источника. Ретровирусы, как правило, являются амфотропными, что означает то, что они способны инфицировать клетки-хозяева из организмов нескольких видов, включая человека. В одном варианте осуществления ген, который должен экспрессироваться, заменяет ретровирусные последовательности gag, pol и/или env. Было описано множество иллюстративных ретровирусных систем (например, патенты США 5,219,740; 6,207,453; 5,219,740; Miller and Rosman (1989) *BioTechniques* 7:980-990; Miller, A. D. (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; и Boris-Lawrie and Temin (1993) *Cur. Opin. Genet. Develop.* 3:102-109).

[0269] Способы лентивирусной трансдукции известны. Примеры таких способов описаны, например, в публикациях 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.

[0270] В некоторых вариантах осуществления вирусные векторные частицы содержат геном, полученный из вектора на основе ретровирусного генома, например, полученный из вектора на основе лентивирусного генома. В некоторых аспектах предложенных вирусных векторов гетерологичная нуклеиновая кислота, кодирующая рекомбинантный рецептор, такой как антигенный рецептор, такой как CAR, содержится и/или расположена между 5'-LTR и 3'-LTR последовательностями векторного генома.

[0271] В некоторых вариантах осуществления вирусный векторный геном представляет собой геном лентивируса, такой как геном ВИЧ-1 или геном ВАО. Например, лентивирусные векторы были получены путем многократного ослабления генов вирулентности, например, гены env, vif, vpr и nef могут быть удалены, что делает вектор более безопасным для терапевтических целей. Лентивирусные векторы известны. См. Naldini et al., (1996 и 1998); Zufferey et al., (1997); Dull et al., 1998, патенты США 6,013,516 и 5,994,136). В некоторых вариантах осуществления эти вирусные векторы основаны на плаزمиде или вирусе и способны нести последовательности, необходимые для встраивания чужеродной нуклеиновой кислоты, для отбора и для переноса нуклеиновой кислоты в клетку-хозяина. Известные лентивирусы могут быть легко получены из депозитариев или коллекций, таких как Американская коллекция типовых культур ("ATCC"; 10801 University Blvd., Manassas, VA. 20110-2209), или выделены из известных источников с использованием общедоступных методик.

[0272] Неограничивающие примеры лентивирусных векторов включают векторы, полученные из лентивируса, такого как вирус иммунодефицита человека 1 (ВИЧ-1), ВИЧ-2, вирус иммунодефицита обезьян (ВАО), Т-лимфотропный вирус человека 1 (HTLV-1), HTLV-2 или вирус инфекционной анемии лошадей (ИНАИ). Например, лентивирусные



векторы были получены путем множественного ослабления генов вирулентности ВИЧ, например, удаления генов *env*, *vif*, *vpr*, *vpu* и *nef*, что делает вектор более безопасным в терапевтических целях. Лентивирусные векторы известны в уровне техники, см. Naldini et al., (1996 и 1998); Zufferey et al., (1997); Dull et al., 1998, патенты США 6,013,516 и 5,994,136). В некоторых вариантах осуществления эти вирусные векторы основаны на плаزمиде или основаны на вирусах и способны нести существенные последовательности для слияния чужеродной нуклеиновой кислоты для отбора и для переноса нуклеиновой кислоты в клетку-хозяина. Известные лентивирусы могут быть с легкостью получены из депозитариев или коллекций, таких как Американская коллекция типовых культур ("ATCC"; 10801 University Blvd., Manassas, VA. 20110-2209), или выделены из известных источников с использованием общедоступных методик.

[0273] В некоторых вариантах осуществления вектор на основе вирусного генома может содержать 5' и 3'-LTR последовательности ретровируса, такого как лентивирус. В некоторых аспектах конструкция на основе вирусного генома может содержать последовательности из 5' и 3'-LTR лентивируса, и, в частности, может содержать R и U5 последовательности из 5'-LTR лентивируса, а также инактивированный или самоинактивирующийся 3'-LTR из лентивируса. Последовательности LTR могут быть последовательностями LTR из любого лентивируса любых биологических видов. Например, они могут быть последовательностями LTR из ВИЧ, ВЮ, ВИК или ВБИ. Как правило, последовательности LTR являются последовательностями LTR ВИЧ.

[0274] В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота вирусного вектора, такого как ВИЧ вирусный вектор, не содержит дополнительных транскрипционных единиц. Векторный геном может содержать инактивированные или самоинактивирующиеся 3'-LTR (Zufferey et al. J Virol 72:9873, 1998; Miyoshi et al., J Virol 72:8150, 1998). Например, делеция в U3 области 3'-LTR нуклеиновой кислоты, используемой для продукции вирусной векторной РНК, может использоваться для создания самоинактивирующихся (SIN) векторов. Эта делеция может быть затем перенесена в 5'-LTR провирусной ДНК в ходе обратной транскрипции. Самоинактивирующийся вектор обычно имеет делецию энхансерных и промоторных последовательностей из 3' длинного концевой повтора (LTR), который копируется в 5'-LTR в ходе интеграции вектора. В некоторых вариантах осуществления могут быть удалены последовательности, включая удаление ТАТА-бокса, что достаточно для устранения транскрипционной активности LTR. Это может предотвратить продукцию полноразмерной векторной РНК в трансдуцированных клетках. В некоторых аспектах U3 элемент 3'-LTR содержит делецию своей энхансерной последовательности, ТАТА-бокса, Sp1 и NF-каппа В сайтов. В результате самоинактивации 3'-LTR, провирус, который образуется после проникновения в клетку и обратной транскрипции, содержит инактивированный 5'-LTR. Это может повысить безопасность путем снижения риска мобилизации векторного генома и влияния LTR на соседние клеточные промоторы. Самоинактивирующийся 3'-LTR может быть сконструирован любым способом, известным

в уровне техники. В некоторых вариантах осуществления это не влияет на векторные титры или свойства вектора *in vitro* или *in vivo*.

[0275] Необязательно, U3 последовательность из лентивирусного 5'-LTR в вирусной конструкции может быть заменена промоторной последовательностью, такой как гетерологичная промоторная последовательность. Это может увеличить титр вируса, выделенного из упаковывающей клеточной линии. Также может быть включена энхансерная последовательность. Может использоваться Любая комбинация энхансера/промотора, повышающая экспрессию вирусного РНК генома в упаковывающей клеточной линии. В одном примере используется последовательность энхансера/промотора ЦМВ (патент США 5,385,839 и патент США 5,168,062).

[0276] В некоторых вариантах осуществления риск инсерционного мутагенеза можно свести к минимуму путем конструирования ретровирусного векторного генома, такого как лентивирусный векторный геном, не способный к интеграции. Различные методы могут использоваться для получения неинтегрирующегося векторного генома. В некоторых вариантах осуществления мутация(и) может быть введена в компонент фермента интегразы гена *pol*, в результате чего он кодирует белок с неактивной интегразой. В некоторых вариантах осуществления можно модифицировать сам векторный геном, чтобы предотвратить интеграцию, например, путем мутации или удаления одного или обоих сайтов прикрепления, или сделав 3'-LTR-проксимальный полипуриновый тракт (PPT) нефункциональным посредством делеции или модификации. В некоторых вариантах осуществления доступны негенетические подходы; они включают фармакологические средства, которые ингибируют одну или более функций интегразы. Такие методы не являются взаимоисключающими; то есть можно одновременно использовать больше одного из них. Например, как сайты интегразы, так и сайты прикрепления могут быть нефункциональными, или могут быть нефункциональными сайт интегразы и PPT, или могут быть нефункциональными сайты прикрепления и сайт PPT, или все они могут быть нефункциональными. Такие методы и вирусные векторные геномы известны и доступны (см. Philpott and Thrasher, *Human Gene Therapy* 18:483, 2007; Engelman et al. *J Virol* 69:2729, 1995; Brown et al *J Virol* 73:9011 (1999); WO 2009/076524; McWilliams et al., *J Virol* 77:11150, 2003; Powell and Levin *J Virol* 70:5288, 1996).

[0277] В некоторых вариантах осуществления вектор содержит последовательности для размножения в клетке-хозяине, такой как прокариотическая клетка-хозяин. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота вирусного вектора содержит одну или более точек начала репликации для размножения в прокариотической клетке, такой как бактериальная клетка. В некоторых вариантах осуществления векторы, включающие прокариотическую точку начала репликации, также могут содержать ген, экспрессия которого дает поддающийся обнаружению или селективный маркер, такой как устойчивость к лекарственному средству.

[0278] Вирусный векторный геном, как правило, конструируют в форме плазмиды, которая может быть трансфицирована в упаковывающую или продуцирующую клеточную

линию. Любой из множества известных методов может использоваться для получения ретровирусных частиц, геном которых содержит РНК копию вирусного векторного генома. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере два компонента участвуют в создании системы доставки гена на основе вируса: во-первых, упаковывающие плазмиды, включающие структурные белки, а также ферменты, необходимые для создания вирусной векторной частицы, и во-вторых, сам вирусный вектор, т.е. генетический материал, который подлежит переносу. Меры гарантии биобезопасности могут быть введены в дизайн одного или обоих таких компонентов.

[0279] В некоторых вариантах осуществления упаковывающая плаزمида может содержать все ретровирусные белки, например, из ВИЧ-1, кроме белков оболочки (Naldini et al., 1998). В других вариантах осуществления вирусные векторы могут не содержать дополнительных вирусных генов, таких как гены, которые связаны с вирулентностью, например, *vpr*, *vif*, *vpr* и *nef*, и/или *Tat*, основной транскриптор ВИЧ. В некоторых вариантах осуществления лентивирусные векторы, такие как лентивирусные векторы на основе ВИЧ, включают только три гена исходного вируса: *gag*, *pol* и *rev*, что снижает или исключает возможность воссоздания вируса дикого типа в результате рекомбинации.

[0280] В некоторых вариантах осуществления вирусный векторный геном вводят в упаковывающую клеточную линию, содержащую все компоненты, необходимые для упаковки вирусной геномной РНК, транскрибированной с вирусного векторного генома, в вирусные частицы. В альтернативе вирусный векторный геном может включать один или более генов, кодирующих вирусные компоненты в дополнение к одной или более последовательностям, например, рекомбинантным нуклеиновым кислотам, представляющим интерес. В некоторых аспектах для предотвращения репликации генома в клетке-мишени, тем не менее, эндогенные вирусные гены, требуемые для репликации, удаляют и предоставляют отдельно в упаковывающей клеточной линии.

[0281] В некоторых вариантах осуществления упаковывающую клеточную линию трансфицируют одним или более плазмидными векторами, содержащими компоненты, необходимые для формирования частиц. В некоторых вариантах осуществления упаковывающую клеточную линию трансфицируют плазмидой, содержащей вирусный векторный геном, включающий LTR повторы, цис-действующую упаковывающую последовательность и последовательность, представляющую интерес, т.е. нуклеиновую кислоту, кодирующую антигенный рецептор, такой как CAR; и одной или более хэлперных плазмид, кодирующих ферментные и/или структурные компоненты вируса, такие как *Gag*, *pol* и/или *rev*. В некоторых вариантах осуществления множество векторов используют для разделения различных генетических компонентов, которые формируют ретровирусные векторные частицы. В некоторых таких вариантах осуществления введение отдельных векторов в упаковывающую клетку уменьшает шанс событий рекомбинации, которые могут в иных условиях приводить к появлению репликационно-компетентных вирусов. В некоторых вариантах осуществления может использоваться один плазмидный вектор, содержащий все ретровирусные компоненты.

[0282] В некоторых вариантах осуществления ретровирусную векторную частицу, такую как лентивирусная векторная частица, псевдотипируют для увеличения эффективности трансдукции клеток-хозяев. Например, ретровирусную векторную частицу, такую как лентивирусная векторная частица, в некоторых вариантах осуществления псевдотипируют гликопротеином VSV-G, что обеспечивает широкий спектр клеток-хозяев с расширением типов клеток, которые могут быть трансдуцированы. В некоторых вариантах осуществления упаковывающую клеточную линию трансфицируют плазмидой или полинуклеотидом, кодирующим ненативный гликопротеин оболочки, например, с включением ксенотропных, политропных или амфотропных оболочек, таких как оболочка вируса Синдбис, GALV или VSV-G.

[0283] В некоторых вариантах осуществления упаковывающая клеточная линия обеспечивает компоненты, включающие вирусные регуляторные и структурные белки, которые требуются в транс-конфигурации для упаковки вирусной геномной РНК в лентивирусные векторные частицы. В некоторых вариантах осуществления упаковывающая клеточная линия может быть любой клеточной линией, которая способна к экспрессии лентивирусных белков и к продукции функциональных лентивирусных векторных частиц. В некоторых аспектах подходящие упаковывающие клеточные линии включают клетки 293 (ATCC CCL X), 293T, HeLA (ATCC CCL 2), D17 (ATCC CCL 183), MDCK (ATCC CCL 34), ВНК (ATCC CCL-10) и Cf2Th (ATCC CRL 1430).

[0284] В некоторых вариантах осуществления упаковывающая клеточная линия стабильно экспрессирует вирусный белок(ки). Например, в некоторых аспектах может быть сконструирована упаковывающая клеточная линия, содержащая gag, pol, rev и/или другие структурные гены, но без LTR и упаковывающих компонентов. В некоторых вариантах осуществления упаковывающая клеточная линия может быть транзистентно трансфицирована молекулами нуклеиновых кислот, кодирующими один или более вирусных белков наряду с вирусным векторным геномом, содержащим молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую гетерологичный белок и/или нуклеиновую кислоту, кодирующую гликопротеин оболочки.

[0285] В некоторых вариантах осуществления вирусные векторы и упаковывающие и/или хэлперные плазмиды вводят путем трансфекции или инфицирования в упаковывающую клеточную линию. Упаковывающая клеточная линия дает вирусные векторные частицы, содержащие вирусный векторный геном. Способы трансфекции или инфицирования известны. Неограничивающие примеры включают методы с использованием фосфата кальция, DEAE-декстрана и липофекции, электропорацию и микроинъекцию.

[0286] При введении рекомбинантной плазмиды и ретровирусных LTR и упаковывающих последовательностей в специальную клеточную линию (например, при осаждении фосфатом кальция), упаковывающие последовательности могут обеспечивать упаковку РНК транскрипта рекомбинантной плазмиды в вирусные частицы, которые затем могут секретироваться в среду культивирования. Затем среды, содержащие

рекомбинантные ретровирусы, в некоторых вариантах осуществления собирают, необязательно концентрируют и используют для переноса генов. Например, в некоторых аспектах, после котрансфекции упаковывающих плазмид и трансферного вектора в упаковывающую клеточную линию вирусные векторные частицы выделяют из сред культивирования и титруют с помощью стандартных методов, используемых специалистами.

[0287] В некоторых вариантах осуществления ретровирусный вектор, такой как лентивирусный вектор, может быть получен в упаковывающей клеточной линии, такой как примерная линия клеток НЕК 293Т, путем введения плазмид для формирования лентивирусных частиц. В некоторых вариантах осуществления упаковывающая клетка трансфицирована и/или содержит полинуклеотид, кодирующий gag и pol, и полинуклеотид, кодирующий рекомбинантный рецептор, такой как антигенный рецептор, например, CAR. В некоторых вариантах осуществления упаковывающая клеточная линия необязательно и/или дополнительно трансфицирована и/или содержит полинуклеотид, кодирующий белок rev. В некоторых вариантах осуществления упаковывающая клеточная линия необязательно и/или дополнительно трансфицирована и/или содержит полинуклеотид, кодирующий ненативный гликопротеин оболочки, такой как VSV-G. В некоторых таких вариантах осуществления, приблизительно через два дня после трансфекции клеток, например, клеток НЕК 293Т, супернатант клеток содержит рекомбинантные лентивирусные векторы, которые могут быть выделены и оттитрованы.

[0288] Выделенные и/или продуцированные ретровирусные векторные частицы можно использовать для трансдукции клеток-мишеней с применением описанных способов. При введении в клетки-мишени вирусная РНК подвергается обратной транскрипции, импортируется в ядро и стабильно интегрируется в хозяйский геном. Через один или два дня после интеграции вирусной РНК может быть обнаружена экспрессия рекомбинантного белка, например, антигенного рецептора, такого как CAR.

[0289] В некоторых вариантах осуществления предложенные способы включают способы трансдукции клеток путем контакта, например, инкубирования, композиции клеток, включающей множество клеток с вирусной частицей. В некоторых вариантах осуществления, клетки, которые требуется трансфицировать или трансдуцировать, представляют собой или включают первичные клетки, полученные у субъекта, такие как клетки, обогащенные и/или отобранные у субъекта.

[0290] В некоторых вариантах осуществления концентрация клеток, подлежащих трансдукции, в композиции составляет от  $1,0 \times 10^5$  клеток/мл до  $1,0 \times 10^8$  клеток/мл или от приблизительно  $1,0 \times 10^5$  клеток/мл до приблизительно  $1,0 \times 10^8$  клеток/мл, например, по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере или приблизительно  $1,0 \times 10^5$  клеток/мл,  $5 \times 10^5$  клеток/мл,  $1 \times 10^6$  клеток,  $5 \times 10^6$  клеток,  $1 \times 10^7$  клеток/мл,  $5 \times 10^7$  клеток/мл или  $1 \times 10^8$  клеток/мл.

[0291] В некоторых вариантах осуществления вирусные частицы предоставляют в некотором отношении копий частиц вирусного вектора или их инфекционных единиц

(ИЕ) к общему количеству клеток, подлежащих трансдукции (ИЕ/клетка). Например, в некоторых вариантах осуществления вирусные частицы присутствуют во время контакта в количестве, составляющем или составляющем приблизительно или по меньшей мере или приблизительно 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50 или 60 ИЕ частиц вирусного вектора на одну из клеток.

[0292] В некоторых вариантах осуществления титр вирусных векторных частиц составляет от или от приблизительно  $1 \times 10^6$  ИЕ/мл до  $1 \times 10^8$  ИЕ/мл, например, от или от приблизительно  $5 \times 10^6$  ИЕ/мл до  $5 \times 10^7$  ИЕ/мл, например, по меньшей мере  $6 \times 10^6$  ИЕ/мл,  $7 \times 10^6$  ИЕ/мл,  $8 \times 10^6$  ИЕ/мл,  $9 \times 10^6$  ИЕ/мл,  $1 \times 10^7$  ИЕ/мл,  $2 \times 10^7$  ИЕ/мл,  $3 \times 10^7$  ИЕ/мл,  $4 \times 10^7$  ИЕ/мл или  $5 \times 10^7$  ИЕ/мл.

[0293] В некоторых вариантах осуществления трансдукция может быть выполнена при множественности инфицирования (МОИ) меньше 100, такой как обычно меньше 60, 50, 40, 30, 20, 10, 5 или меньше.

[0294] В некоторых вариантах осуществления способ включает контакт или инкубирование клеток с вирусными частицами. В некоторых вариантах осуществления контакт осуществляется в течение от 30 минут до 72 часов, например, от 30 минут до 48 часов, от 30 минут до 24 часов или от 1 часа до 24 часов, например, по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере или приблизительно 30 минут, 1 часа, 2 часов, 6 часов, 12 часов, 24 часов, 36 часов или больше.

[0295] В некоторых вариантах осуществления контакт производят в растворе. В некоторых вариантах осуществления клетки и вирусные частицы подвергают контакту в объеме от 0,5 мл до 500 мл или от приблизительно 0,5 мл до приблизительно 500 мл, таким как от или от приблизительно 0,5 мл до 200 мл, от 0,5 мл до 100 мл, от 0,5 мл до 50 мл, от 0,5 мл до 10 мл, от 0,5 мл до 5 мл, от 5 мл до 500 мл, от 5 мл до 200 мл, от 5 мл до 100 мл, от 5 мл до 50 мл, от 5 мл до 10 мл, от 10 мл до 500 мл, от 10 мл до 200 мл, от 10 мл до 100 мл, от 10 мл до 50 мл, от 50 мл до 500 мл, от 50 мл до 200 мл, от 50 мл до 100 мл, от 100 мл до 500 мл, от 100 мл до 200 мл или от 200 мл до 500 мл.

[0296] В некоторых вариантах осуществления исходные клетки обрабатывают, инкубируют или подвергают контакту с частицами, которые включают связывающие молекулы, которые связывают или распознают рекомбинантный рецептор, кодируемый вирусной ДНК.

[0297] В некоторых вариантах осуществления инкубирование клеток с вирусными векторными частицами приводит к получению или продукции готовой композиции, включающей клетки, трансдуцированные вирусными векторными частицами.

#### *в. Невирусные векторы*

[0298] В некоторых вариантах осуществления рекомбинантные нуклеиновые кислоты переносят в Т-клетки путем электропорации (см., например, Chicaubam et al. (2013) PLoS ONE 8(3):e60298 и Van Tedeloo et al. (2000) Gene Therapy 7(16):1431-1437). В некоторых вариантах осуществления рекомбинантные нуклеиновые кислоты переносят в Т-клетки путем 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 с фосфатом кальция (например, как описано в *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, New York, N.Y.), слияние протопластов, опосредованную катионными липосомами трансфекцию; бомбардировку с использованием микрочастиц вольфрама (Johnston, *Nature*, 346:776-777 (1990)); и совместное осаждение ДНК фосфатом стронция (Brash et al., *Mol. Cell Biol.*, 7:2031-2034 (1987)).

[0299] Другие методы и векторы для переноса нуклеиновых кислот, кодирующих рекомбинантные продукты, описаны, например, в публикации международной заявки WO2014055668 и патенте США 7,446,190.

[0300] В некоторых вариантах осуществления рекомбинантные нуклеиновые кислоты переносят в Т-клетки посредством транспозонов. Транспозоны (транспозируемые элементы) представляют собой мобильные сегменты ДНК, которые могут перемещаться из одного локуса в другой в геномах. Эти элементы движутся по консервативному механизму "вырезать и вставить": транспозаза катализирует удаление транспозона из его исходного положения и способствует его реинтеграции в другом участке генома. Элементы, не имеющие собственной транспозазы, могут перемещаться, если транспозаза предоставлена другим геном транспозазы. Таким образом, транспозоны могут использоваться для встраивания чужеродной ДНК в хозяйский геном без использования системы вирусной трансдукции. Примеры транспозонов, подходящих для применения с клетками млекопитающих, например первичными лейкоцитами человека, включают, без ограничения, *Sleeping Beauty* и *Piggybac*.

[0301] Трансфекция на основе транспозонов представляет собой двухкомпонентную систему, состоящую из транспозазы и транспозона. В некоторых вариантах осуществления система содержит транспозон, сконструированный так, что он содержит чужеродную ДНК (также называемую в настоящем документе ДНК-нагрузкой), например, ген, кодирующий рекомбинантный рецептор, который фланкирован последовательностями с инвертированными повторами/прямыми повторами (IR/DR), которые распознает сопровождающая транспозаза. В некоторых вариантах осуществления невирусная плаزمиды кодирует транспозазу под контролем промотора. Трансфекция плазмиды в клетку-хозяина приводит к транзитной экспрессии транспозазы, при этом в течение начального периода после трансфекции транспозаза экспрессируется на достаточном уровне для интеграции транспозона в геномную ДНК. В некоторых вариантах осуществления сама транспозаза не интегрируется в геномную ДНК, и поэтому экспрессия транспозазы со временем снижается. В некоторых вариантах осуществления экспрессия транспозазы экспрессируется клеткой-хозяином на уровнях, достаточных для интеграции соответствующего транспозона в течение меньше чем приблизительно 4 часов, меньше чем приблизительно 8 часов, меньше чем приблизительно 12 часов, меньше чем приблизительно 24 часов, меньше чем приблизительно 2 дня, меньше чем

приблизительно 3 дня, меньше чем приблизительно 4 дня, меньше чем приблизительно 5 дней, меньше чем приблизительно 6 дней, меньше чем приблизительно 7 дней, меньше чем приблизительно 2 недель, меньше чем приблизительно 3 недель, меньше чем приблизительно 4 недель, меньше чем приблизительно недели или меньше чем приблизительно 8 недель. В некоторых вариантах осуществления ДНК-нагрузка, которую вводят в хозяйский геном, впоследствии не удаляется из генома хозяина, по меньшей мере, потому что хозяин не экспрессирует эндогенную транспозазу, способную вырезать ДНК-нагрузку.

[0302] Sleeping Beauty (от англ. Спящая красавица, SB) является синтетическим представителем суперсемейства транспозонов Tc1/mariner, реконструированных из покоящихся элементов, содержащихся в геноме лососевых рыб. Трансфекция на основе транспозона SB представляет собой двухкомпонентную систему, состоящую из транспозазы и транспозона, содержащего последовательности с инвертированными повторами/прямыми повторами (IR/DR), которые приводят к точной интеграции в динуклеотид ТА. Транспозон сконструирован с представляющей интерес кассетой экспрессии, фланкированной IR/DR последовательностями. Транспозаза SB связывает специфические сайты связывания, которые расположены на IR транспозона Sleeping Beauty. Транспозаза SB обеспечивает интеграцию транспозона, мобильного элемента, кодирующего последовательность нагрузки, фланкированную с обеих сторон инвертированными концевыми повторами, которые содержат сайты связывания каталитического фермента (SB). Стабильная экспрессия наблюдается, когда SB встраивает последовательности генов в хромосомы позвоночных в динуклеотид-мишень ТА по механизму "вырезать и вставить". Эту систему использовали для модификации множества типов клеток позвоночных, включая первичные лейкоциты периферической крови человека. В некоторых вариантах осуществления клетки подвергают контакту, инкубируют и/или обрабатывают транспозоном SB, содержащим ген-нагрузку, например, ген, кодирующий рекомбинантный рецептор или CAR, фланкированный IR-последовательностями SB. В конкретных вариантах осуществления клетки, подлежащие трансфекции, подвергают контакту, инкубируют и/или обрабатывают плазмидой, содержащей транспозон SB, содержащий ген-нагрузку, например ген, кодирующий CAR, фланкированный IR-последовательностями SB. В некоторых вариантах осуществления плазида дополнительно содержит ген, кодирующий транспозазу SB, который не фланкирован IR-последовательностями SB.

[0303] PiggyBac (PB) представляет собой другую систему на основе транспозона, которая может использоваться для интеграции ДНК-нагрузки, например, в геномную ДНК человека. Транспозаза PB распознает специфичные для транспозона PB последовательности инвертированных концевых повторов (ITR), расположенные на обоих концах транспозона, и эффективно перемещает содержимое из исходных сайтов и эффективно интегрирует их в хромосомные сайты TТАА. Система на основе транспозона PB позволяет перемещать представляющие интерес гены, расположенные между двумя



ITR в векторе РВ, в геномы-мишени. Систему РВ использовали для модификации различных типов клеток позвоночных, включая первичные клетки человека. В некоторых вариантах осуществления клетки, подлежащие трансфекции, приводят в контакт, инкубируют и/или обрабатывают транспозоном РВ, содержащим ген-нагрузку, например ген, кодирующий CAR, фланкированный IR-последовательностями РВ. В конкретных вариантах осуществления клетки, подлежащие трансфекции, приводят в контакт, инкубируют и/или обрабатывают плазмидой, содержащей транспозон РВ, содержащий ген-нагрузку, например ген, кодирующий CAR, фланкированный IR-последовательностями РВ. В некоторых вариантах осуществления плазида дополнительно содержит ген, кодирующий транспозазу SB, который не фланкирован IR-последовательностями РВ.

[0304] В некоторых вариантах осуществления различные элементы транспозона/транспозазы, используемые в рассматриваемых способах, например, SB или РВ вектор(ы), могут быть получены стандартными способами расщепления рестриктазами, лигирования и молекулярного клонирования. Одна из методик конструирования рассматриваемых векторов включает следующие этапы. Сначала очищенные фрагменты нуклеиновых кислот, содержащие требуемые компоненты нуклеотидных последовательностей, а также дополнительные последовательности, расщепляют эндонуклеазами рестрикции из исходных источников, например, вектора, содержащего ген транспозазы. Фрагменты, содержащие требуемые нуклеотидные последовательности, затем отделяют от нежелательных фрагментов разного размера при использовании стандартных методов разделения, например, электрофореза в агарозном геле. Нужные фрагменты вырезают из геля и лигируют друг с другом в соответствующей конфигурации с получением кольцевой нуклеиновой кислоты или плазмиды, содержащей требуемые последовательности, например, последовательности, соответствующие различным элементам рассматриваемых векторов, как описано выше. При необходимости кольцевые молекулы, сконструированные таким образом, затем амплифицируют в прокариотическом хозяине, например, в *E.coli*. Процедуры расщепления, конструирования плазмид, трансформации клеток и получения плазмид, используемые на этих стадиях, хорошо известны специалисту в данной области, а ферменты, требуемые для рестрикции и лигирования, доступны в продаже (см., например, R. Wu, Ed., *Methods in Enzymology*, Vol. 68, Academic Press, N.Y. (1979); T. Maniatis, E. F. Fritsch and J. Sambrook, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1982); Catalog 1982-83, New England Biolabs, Inc.; Catalog 1982-83, Bethesda Research Laboratories, Inc. Пример того, как конструировать векторы, используемые в рассматриваемых способах, представлен в Экспериментальном разделе ниже. Получение репрезентативной системы на основе транспозона Sleeping Beauty также раскрыто в WO 98/40510 и WO 99/25817).

[0305] В некоторых вариантах осуществления трансдукцию транспозонами осуществляют при использовании плазмиды, которая содержит ген транспозазы, и

плазмиды, которая содержит транспозон, который содержит последовательность ДНК-нагрузки, которая фланкирована последовательностями инвертированных повторов/прямых повторов (IR/DR), которые распознает транспозаза. В некоторых вариантах осуществления последовательность ДНК-нагрузки кодирует гетерологичный белок, например, рекомбинантный Т-клеточный рецептор или CAR. В некоторых вариантах осуществления плазида содержит транспозазу и транспозон. В некоторых вариантах осуществления транспозаза находится под контролем универсального промотора или любого промотора, подходящего для контроля экспрессии транспозазы в клетке-мишени. Универсальные промоторы включают, без ограничения перечисленными: EF1a, CMV, SV40, PGK1, Ubc,  $\beta$ -актин человека, CAG, TRE, UAS, Ac5, CaMKIIa и U6. В некоторых вариантах осуществления ДНК-нагрузка содержит селективную кассету, позволяющую отбирать клетки со стабильной интеграцией ДНК-нагрузки в геномную ДНК. Подходящие селективные кассеты включают, без ограничения перечисленными, селективные кассеты, кодирующие ген устойчивости к канамицину, ген устойчивости к спектиномицину, ген устойчивости к стрептомицину, ген устойчивости к ампициллину, ген устойчивости к карбенициллину, ген устойчивости к гигромицину, ген устойчивости к блеомицину, ген устойчивости к эритромицину и ген устойчивости к полимиксину В.

[0306] В некоторых вариантах осуществления компоненты для трансдукции с использованием транспозона, например, плазмиды, включающие транспозазу SB и транспозон SB, вводят в клетку-мишень. Может использоваться любая удобная методика, которая может включать *in vitro* или *in vivo* введение компонентов системы в клетку-мишень, в зависимости от локализации клетки-мишени. Например, если клетка-мишень является выделенной клеткой, систему могут вводить непосредственно в клетку в условиях культивирования клеток, что обеспечивает жизнеспособность клетки-мишени, например, при помощи стандартных методов трансдукции. Такие методы включают, но не ограничиваются обязательно следующим: вирусную инфекцию, трансформацию, конъюгирование, слияние протопластов, электропорацию, баллистические технологии, осаждение фосфатом кальция, прямую микроинъекцию, доставку вирусными векторами и т.п. Выбор метода обычно зависит от типа трансформируемой клетки и обстоятельств, при которых происходит трансформация (т.е. *in vitro*, *ex vivo*, или *in vivo*). Общее обсуждение этих методов можно найти в Ausubel, et al, *Short Protocols in Molecular Biology*, 3rd ed., Wiley & Sons, 1995.

[0307] В некоторых вариантах осуществления источник транспозона SB и транспозазы SB вводят в клетку-мишень многоклеточного организма, например, млекопитающего или человека, при условиях, достаточных для вырезания инвертированного повтора, фланкированного нуклеиновой кислотой из вектора, несущего транспозон, и последующей интеграции вырезанной нуклеиновой кислоты в геном клетки-мишени. Некоторые варианты осуществления дополнительно включают этап подтверждения, что необходимая активность транспозазы присутствует в клетке-мишени вместе с введенным транспозоном. В зависимости от структуры самого вектора, несущего

транспозон, т.е. от того, включает ли вектор область, кодирующую продукт, обладающий активностью транспозазы, способ может дополнительно включать введение второго вектора в клетку-мишень, который кодирует необходимую активность транспозазы.

[0308] В некоторых вариантах осуществления количество векторной нуклеиновой кислоты, включающей транспозон, и количество векторной нуклеиновой кислоты, кодирующей транспозазу, вводимое в клетку, является достаточным, чтобы обеспечить требуемое вырезание и вставку нуклеиновой кислоты транспозона в геном клетки-мишени. Таким образом, количество вводимой векторной нуклеиновой кислоты должно обеспечить достаточный уровень активности транспозазы и достаточное количество копий нуклеиновой кислоты, которую нужно ввести в клетку-мишень. Количество векторной нуклеиновой кислоты, вводимой в клетку-мишень, изменяется в зависимости от эффективности конкретной используемой методики введения, например, конкретной используемой методики введения *ex vivo*.

[0309] После введения векторной ДНК в клетку-мишень в комбинации с требуемой транспозазой, область нуклеиновой кислоты вектора, которая фланкирована инвертированными повторами, т.е. векторная нуклеиновая кислота, расположенная между транспозазой *Sleeping Beauty*, которая распознает инвертированные повторы, вырезается из вектора предоставленной транспозазой и встраивается в геном клетки-мишени. Таким образом, введение векторной ДНК в клетку-мишень сопровождается последующим опосредованным транспозазой вырезанием и вставкой экзогенной нуклеиновой кислоты, которую несет вектор, в геном клетки-мишени. В конкретных вариантах осуществления вектор интегрируется в геномы по меньшей мере 1%, по меньшей мере 2%, по меньшей мере 3%, по меньшей мере 4%, по меньшей мере 5%, по меньшей мере 6%, по меньшей мере 7%, по меньшей мере 8%, по меньшей мере 9%, по меньшей мере 10%, по меньшей мере 15% или по меньшей мере 20% клеток, которые трансфицируют транспозоном *SB* и/или транспозазой *SB*. В некоторых вариантах осуществления интеграция нуклеиновой кислоты в геном клетки-мишени является стабильной, то есть нуклеиновая кислота-вектор остается в геноме клетки-мишени дольше транзитного периода времени и передается на части хромосомного генетического материала потомству клетки-мишени.

[0310] В некоторых вариантах осуществления транспозоны используются для интеграции нуклеиновых кислот, то есть полинуклеотидов, разных размеров в геном клетки-мишени. В некоторых вариантах осуществления размер ДНК, которую встраивают в геном клетки-мишени с применением способов согласно настоящему изобретению, находится в пределах от приблизительно 0,1 до 200 тпн, от приблизительно 0,5 до 100 тпн, от приблизительно 1,0 до приблизительно 8,0 тпн, от приблизительно 1,0 до приблизительно 200 тпн, от приблизительно 1,0 до приблизительно 10 тпн, от приблизительно 10 тпн до приблизительно 50 тпн, от приблизительно 50 тпн до приблизительно 100 тпн или от приблизительно 100 тпн до приблизительно 200 тпн. В некоторых вариантах осуществления размер ДНК, которую встраивают в геном клетки-мишени с применением способов согласно настоящему изобретению, находится в

пределах от приблизительно 1,0 до приблизительно 8,0 тпн. В некоторых вариантах осуществления размер ДНК, которую встраивают в геном клетки-мишени с применением способов согласно настоящему изобретению, находится в пределах от приблизительно 1,0 до приблизительно 200 тпн. В конкретных вариантах осуществления размер ДНК, которую встраивают в геном клетки-мишени с применением способов согласно настоящему изобретению, находится в пределах от приблизительно 1,0 до приблизительно 8,0 тпн.

#### **D. Культивирование и/или размножение клеток**

[0311] В некоторых вариантах осуществления предложенные способы включают один или более этапов культивирования клеток, например, культивирования клетки в условиях, которые вызывают пролиферацию и/или размножение. В некоторых вариантах осуществления клетки культивируют в условиях, которые вызывают пролиферацию и/или размножение, после этапа генетической модификации, например, введения рекомбинантного полипептида в клетки при трансдукции или трансфекции. В конкретных вариантах осуществления клетки культивируют после инкубирования клеток при стимулирующих условиях и трансдукции или трансфекции рекомбинантным полинуклеотидом, например, полинуклеотидом, кодирующим рекомбинантный рецептор. В некоторых вариантах осуществления в результате культивирования получают одну или более культивированных композиций обогащенных Т-клеток.

[0312] В некоторых вариантах осуществления одна или более композиций обогащенных Т-клеток, включающих стимулированные и трансдуцированные Т-клетки, такие как отдельные композиции таких CD4+ и CD8+ Т-клеток, культивируют, например, при условиях, которые вызывают пролиферацию и/или размножение, перед включением клеток в состав. В некоторых аспектах способы культивирования, например, чтобы вызвать пролиферацию и/или размножение, включают способы, представленные в настоящем документе, например, в Разделе I-F. В конкретных вариантах осуществления одну или более композиций обогащенных Т-клеток культивируют после модификации одной или более композиций, например, трансдукции или трансфекции. В конкретных вариантах осуществления одна или более композиций являются модифицированными композициями. В конкретных вариантах осуществления одна или более модифицированных композиций были ранее подвергнуты криозаморозке и хранению и разморожены перед культивированием.

[0313] В некоторых вариантах осуществления одна или более композиций модифицированных Т-клеток представляют собой или включают две отдельных композиции обогащенных Т-клеток. В конкретных вариантах осуществления две отдельных композиции обогащенных Т-клеток, например, две отдельных композиции обогащенных Т-клеток, отобранных, выделенных и/или обогащенных из одного и того же биологического образца, в которые был введен рекомбинантный рецептор (например, CAR), отдельно культивируют при условиях, которые вызывают пролиферацию и/или размножение клеток. В некоторых вариантах осуществления условия являются

стимулирующими условиями. В некоторых вариантах осуществления две отдельных композиции включают композицию обогащенных CD4+ Т-клеток, таких как модифицированные CD4+ Т-клетки, в которые была введена нуклеиновая кислота, кодирующая рекомбинантный рецептор, и/или которые экспрессируют рекомбинантный рецептор. В конкретных вариантах осуществления две отдельных композиции включают композицию обогащенных CD8+ Т-клеток, таких как модифицированные CD8+ Т-клетки, в которые была введена нуклеиновая кислота, кодирующая рекомбинантный рецептор, и/или которые экспрессируют рекомбинантный рецептор. В некоторых вариантах осуществления две отдельных композиции обогащенных CD4+ Т-клеток и обогащенных CD8+ Т-клеток, таких как модифицированные CD4+ Т-клетки и модифицированные CD8+ Т-клетки, культивируют отдельно, например, при условиях, которые вызывают пролиферацию и/или размножение. В некоторых вариантах осуществления культивируют одну композицию обогащенных Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления одна композиция является композицией обогащенных CD4+ Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления одна композиция является композицией обогащенных CD4+ и CD8+ Т-клеток, объединенной из отдельных композиций перед культивированием.

[0314] В некоторых вариантах осуществления композиция обогащенных CD4+ Т-клеток, таких как модифицированные CD4+ Т-клетки, которые культивируют, например, при условиях, которые вызывают пролиферацию и/или размножение, включает по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99%, по меньшей мере 99,5%, по меньшей мере 99,9% или 100% или приблизительно 100% CD4+ Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления композиция включает по меньшей мере 30%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99%, по меньшей мере 99,5%, по меньшей мере 99,9% или 100% или приблизительно 100% CD4+ Т-клеток, которые экспрессируют рекомбинантный рецептор и/или были трансдуцированы или трансфицированы рекомбинантным полинуклеотидом, кодирующим рекомбинантный рецептор. В некоторых вариантах осуществления композиция обогащенных CD4+ Т-клеток, которые культивируют, включает меньше 40%, меньше 35%, меньше 30%, меньше 25%, меньше 20%, меньше 15%, меньше 10%, меньше 5%, меньше 1%, меньше 0,1% или меньше 0,01% CD8+ Т-клеток, и/или не содержит CD8+ Т-клетки, и/или не содержит или по существу не содержит CD8+ Т-клетки.

[0315] В некоторых вариантах осуществления композиция обогащенных CD8+ Т-клеток, таких как модифицированные CD8+ Т-клетки, которые культивируют, например, при условиях, которые вызывают пролиферацию и/или размножение, включает по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99%, по меньшей мере 99,5%, по меньшей мере

мере 99,9% или 100% или приблизительно 100% CD8+ Т-клеток. В конкретных вариантах осуществления композиция включает по меньшей мере 30%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99%, по меньшей мере 99,5%, по меньшей мере 99,9% или 100% или приблизительно 100% CD8+ Т-клеток, которые экспрессируют рекомбинантный рецептор и/или были трансдуцированы или трансфицированы рекомбинантным полинуклеотидом, кодирующим рекомбинантный рецептор. В некоторых вариантах осуществления композиция обогащенных CD8+ Т-клеток, которую инкубируют при стимулирующих условиях, включает меньше 40%, меньше 35%, меньше 30%, меньше 25%, меньше 20%, меньше 15%, меньше 10%, меньше 5%, меньше 1%, меньше 0,1% или меньше 0,01% CD4+ Т-клеток, и/или не содержит CD4+ Т-клетки, и/или не содержит или по существу не содержит CD4+ Т-клетки.

[0316] В некоторых вариантах осуществления отдельных композиций обогащенных CD4+ и CD8+ Т-клеток, такие как отдельные композиции модифицированных CD4+ и модифицированных CD8+ Т-клеток, объединяют в одну композицию и культивируют, например, при условиях, которые вызывают пролиферацию и/или размножение. В некоторых вариантах осуществления отдельные культивированные композиции обогащенных CD4+ и обогащенных CD8+ Т-клеток объединяют в одну композицию после выполнения и/или завершения культивирования. В конкретных вариантах осуществления отдельные композиции обогащенных CD4+ и CD8+ Т-клеток, такие как отдельные композиции модифицированных CD4+ и модифицированных CD8+ Т-клеток, культивируют отдельно, например, при условиях, которые вызывают пролиферацию и/или размножение.

[0317] В некоторых вариантах осуществления клетки, например, модифицированные клетки, культивируют в объеме среды, который составляет, составляет приблизительно или составляет по меньшей мере 100 мл, 200 мл, 300 мл, 400 мл, 500 мл, 600 мл, 700 мл, 800 мл, 900 мл, 1000 мл, 1200 мл, 1400 мл, 1600 мл, 1800 мл, 2000 мл, 2200 мл или 2400 мл. В некоторых вариантах осуществления клетки культивируют в начальном объеме, который позже регулируют до другого объема. В конкретных вариантах осуществления объем регулируют позже во время культивирования. В конкретных вариантах осуществления объем увеличивается от начального объема во время культивирования. В некоторых вариантах осуществления объем увеличивается, когда клетки достигают некоторой плотности во время культивирования. В определенном варианте осуществления начальный объем составляет или составляет приблизительно 500 мл.

[0318] В конкретных вариантах осуществления объем увеличивается от начального объема, когда клетки достигают некоторой плотности или концентрации во время культивирования. В конкретных вариантах осуществления объем увеличивается, когда клетки достигают плотности и/или концентрации равной, равной приблизительно или по

меньшей мере  $0,1 \times 10^6$  клеток/мл,  $0,2 \times 10^6$  клеток/мл,  $0,4 \times 10^6$  клеток/мл,  $0,6 \times 10^6$  клеток/мл,  $0,8 \times 10^6$  клеток/мл,  $1 \times 10^6$  клеток/мл,  $1,2 \times 10^6$  клеток/мл,  $1,4 \times 10^6$  клеток/мл,  $1,6 \times 10^6$  клеток/мл,  $1,8 \times 10^6$  клеток/мл,  $2,0 \times 10^6$  клеток/мл,  $2,5 \times 10^6$  клеток/мл,  $3,0 \times 10^6$  клеток/мл,  $3,5 \times 10^6$  клеток/мл,  $4,0 \times 10^6$  клеток/мл,  $4,5 \times 10^6$  клеток/мл,  $5,0 \times 10^6$  клеток/мл,  $6 \times 10^6$  клеток/мл,  $8 \times 10^6$  клеток/мл или  $10 \times 10^6$  клеток/мл. В некоторых вариантах осуществления объем увеличивается от начального объема, когда клетки достигают плотности и/или концентрации, равной, равной по меньшей мере или равной приблизительно  $0,6 \times 10^6$  клеток/мл. В некоторых вариантах осуществления плотность и/или концентрация относится к жизнеспособным клеткам в культуре. В конкретных вариантах осуществления объем увеличивается, когда клетки достигают плотности и/или концентрации, равной, равной приблизительно или равной по меньшей мере  $0,1 \times 10^6$  жизнеспособных клеток/мл,  $0,2 \times 10^6$  жизнеспособных клеток/мл,  $0,4 \times 10^6$  жизнеспособных клеток/мл,  $0,6 \times 10^6$  жизнеспособных клеток/мл,  $0,8 \times 10^6$  жизнеспособных клеток/мл,  $1 \times 10^6$  жизнеспособных клеток/мл,  $1,2 \times 10^6$  жизнеспособных клеток/мл,  $1,4 \times 10^6$  жизнеспособных клеток/мл,  $1,6 \times 10^6$  жизнеспособных клеток/мл,  $1,8 \times 10^6$  жизнеспособных клеток/мл,  $2,0 \times 10^6$  жизнеспособных клеток/мл,  $2,5 \times 10^6$  жизнеспособных клеток/мл,  $3,0 \times 10^6$  жизнеспособных клеток/мл,  $3,5 \times 10^6$  жизнеспособных клеток/мл,  $4,0 \times 10^6$  жизнеспособных клеток/мл,  $4,5 \times 10^6$  жизнеспособных клеток/мл,  $5,0 \times 10^6$  жизнеспособных клеток/мл,  $6 \times 10^6$  жизнеспособных клеток/мл,  $8 \times 10^6$  жизнеспособных клеток/мл или  $10 \times 10^6$  жизнеспособных клеток/мл. В некоторых вариантах осуществления объем увеличивается от начального объема, когда жизнеспособные клетки достигают плотности и/или концентрации, равной, равной по меньшей мере или равной приблизительно  $0,6 \times 10^6$  жизнеспособных клеток/мл. В некоторых вариантах осуществления плотность и/или концентрация клеток или жизнеспособных клеток может быть определена или проверена во время культивирования, например, при использовании описанных методов, включая оптические методы, в том числе цифровой голографической микроскопии (DHM) или дифференциальной цифровой голографической микроскопии (DDHM).

[0319] В некоторых вариантах осуществления клетки достигают некоторой плотности и/или концентрации, при этом объем увеличивается на, приблизительно на или по меньшей мере на 100 мл, 200 мл, 300 мл, 400 мл, 500 мл, 600 мл, 700 мл, 800 мл, 900 мл, 1000 мл, 1200 мл, 1400 мл, 1600 мл, 1800 мл, 2000 мл, 2200 мл или 2400 мл. В некоторых вариантах осуществления объем увеличивается на 500 мл. В конкретных вариантах осуществления, объем увеличивается до объема, равного, равного приблизительно или равного по меньшей мере 500 мл, 600 мл, 700 мл, 800 мл, 900 мл, 1000 мл, 1200 мл, 1400 мл, 1600 мл, 1800 мл, 2000 мл, 2200 мл или 2400 мл. В некоторых вариантах осуществления объем увеличивается до объема 1000 мл. В некоторых вариантах осуществления объем увеличивается со скоростью, равной, равной по меньшей мере или равной приблизительно 5 мл, 10 мл, 20 мл, 25 мл, 30 мл, 40 мл, 50 мл, 60 мл, 70 мл, 75 мл, 80 мл, 90 мл или 100 мл за 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 минут. В некоторых вариантах осуществления скорость составляет или составляет приблизительно 50 мл за 8

минут.

[0320] В некоторых вариантах осуществления композицию обогащенных Т-клеток, таких как модифицированные Т-клетки, культивируют при условиях, которые вызывают пролиферацию и/или размножение. В некоторых вариантах осуществления такие условия могут быть подобраны так, чтобы обеспечивать пролиферацию, размножение, активацию и/или выживание клеток в популяции. В конкретных вариантах осуществления стимулирующие условия могут включать одну или более конкретных сред, температуру, содержание кислорода, содержание углекислого газа, время, вещества, например, питательные вещества, аминокислоты, антибиотики, ионы и/или стимулирующие факторы, такие как цитокины, хемокины, антигены, партнеры по связыванию, слитые белки, рекомбинантные растворимые рецепторы и любые другие вещества, разработанные, чтобы вызывать рост, деление и/или размножение клеток.

[0321] В некоторых вариантах осуществления культивирование проводят при условиях, обычно включающих температуру, подходящую для роста первичных иммунных клеток, таких как человеческие Т-лимфоциты, например, по меньшей мере приблизительно 25 градусов Цельсия, обычно по меньшей мере приблизительно 30 градусов, и обычно 37 или приблизительно 37 градусов Цельсия. В некоторых вариантах осуществления композицию обогащенных Т-клеток инкубируют при температуре 25-38°C, такой как 30-37°C, например, при 37±2°C или приблизительно 37±2°C. В некоторых вариантах осуществления инкубирование проводят в течение некоторого периода времени, пока культура, например, культивирование или размножение, не приводит к требуемой или пороговой плотности, концентрации, количеству или дозе клеток. В некоторых вариантах осуществления инкубирование проводят в течение некоторого периода времени, пока культура, например, культивирование или размножение, не приводит к требуемой или пороговой плотности, концентрации, количеству или дозе жизнеспособных клеток. В некоторых вариантах осуществления инкубирование производят больше или больше чем приблизительно или производят в течение приблизительно 24 часов, 48 часов, 72 часов, 96 часов, 5 дней, 6 дней, 7 дней, 8 дней, 9 дней или больше. В некоторых вариантах осуществления плотность, концентрация и/или количество или доза клеток могут определять или контролировать в течение культивирования, например, при помощи описанных методов, включая оптические методы, в том числе цифровой голографической микроскопии (DHM) или дифференциальной цифровой голографической микроскопии (DDHM).

[0322] В некоторых вариантах осуществления стимулирующий реагент удаляют и/или отделяют от клеток до культивирования. В некоторых вариантах осуществления стимулирующее средство удаляют и/или отделяют от клеток после модификации и до культивирования модифицированных клеток, например, при условиях, которые вызывают пролиферацию и/или размножение. В некоторых вариантах осуществления стимулирующий реагент является стимулирующим реагентом, описанным в настоящем документе, например, в Разделе I-B-1. В конкретных вариантах осуществления



стимулирующий реагент удаляют и/или отделяют от клеток, как описано в настоящем документе, например, в Разделе I-B-2.

[0323] В конкретных вариантах осуществления композицию обогащенных Т-клеток, таких как модифицированные Т-клетки, например, отдельные композиции модифицированных CD4+ Т-клеток и модифицированных CD8+ Т-клеток, культивируют в присутствии одного или более цитокинов. В некоторых вариантах осуществления один или более цитокинов являются рекомбинантными цитокинами. В конкретных вариантах осуществления один или более цитокинов являются человеческими рекомбинантными цитокинами. В некоторых вариантах осуществления один или более цитокинов связываются и/или способны к связыванию с рецепторами, которые экспрессируются и/или являются эндогенными в Т-клетках. В конкретных вариантах осуществления один или более цитокинов представляют собой или включают члена семейства цитокинов с пучком из 4 альфа-спиралей. В некоторых вариантах осуществления члены семейства цитокинов с пучком из 4 альфа-спиралей включают, без ограничения перечисленными, интерлейкин-2 (IL-2), интерлейкин-4 (IL-4), интерлейкин-7 (IL-7), интерлейкин-9 (IL-9), интерлейкин-12 (IL-12), интерлейкин-15 (IL-15), гранулоцитарный колониестимулирующий фактор (Г-КСФ) и гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (ГМ-КСФ). В некоторых вариантах осуществления один или более цитокинов представляют собой или включают IL-15. В конкретных вариантах осуществления один или более цитокинов представляют собой или включают IL-7. В конкретных вариантах осуществления один или более цитокинов представляют собой или включают IL-2.

[0324] В конкретных вариантах осуществления композицию обогащенных CD4+ Т-клеток, таких как модифицированные CD4+ Т-клетки, культивируют с рекомбинантным IL-2. В некоторых вариантах осуществления культивирование композиции обогащенных CD4+ Т-клеток, таких как модифицированные CD4+ Т-клетки, в присутствии рекомбинантного IL-2 увеличивает возможность или вероятность, что CD4+ Т-клетки композиции сохранят жизнеспособность, способность к росту, размножению и/или активации во время этапа культивирования и в течение всего процесса. В некоторых вариантах осуществления культивирование композиции обогащенных CD4+ Т-клеток, таких как модифицированные CD4+ Т-клетки, в присутствии рекомбинантного IL-2 увеличивает возможность и/или вероятность того, что готовая композиция обогащенных CD4+ Т-клеток, например, модифицированных CD4+ Т-клеток, подходящих для клеточной терапии, будет получена из композиции, обогащенной CD4+ Т-клетками по меньшей мере на 0,5%, по меньшей мере на 1%, по меньшей мере на 2%, по меньшей мере на 3%, по меньшей мере на 4%, по меньшей мере на 5%, по меньшей мере на 6%, по меньшей мере на 7%, по меньшей мере на 8%, по меньшей мере на 9%, по меньшей мере на 10%, по меньшей мере на 11%, по меньшей мере на 12%, по меньшей мере на 13%, по меньшей мере на 14%, по меньшей мере на 15%, по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 40%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на

60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 100% или по меньшей мере на 200% CD4+ по сравнению с альтернативным и/или примерным способом, в котором композицию обогащенных CD4+ Т-клеток не культивируют в присутствии рекомбинантного IL-2.

[0325] В некоторых вариантах осуществления, клетки, такие как отдельные композиции модифицированных CD4+ Т-клеток и модифицированных CD8+ Т-клеток, культивируют с цитокином, например, рекомбинантным человеческим цитокином, в концентрации от 1 МЕ/мл до 2000 МЕ/мл, от 10 МЕ/мл до 100 МЕ/мл, от 50 МЕ/мл до 500 МЕ/мл, от 100 МЕ/мл до 200 МЕ/мл, от 500 МЕ/мл до 1400 МЕ/мл, от 250 МЕ/мл до 500 МЕ/мл или от 500 МЕ/мл до 2500 МЕ/мл.

[0326] В некоторых вариантах осуществления композицию обогащенных из Т-клеток, таких как отдельные композиции модифицированных CD4+ Т-клеток и CD8+ Т-клеток, культивируют с рекомбинантным IL-2, например, человеческим рекомбинантным IL-2, в концентрации от 2 МЕ/мл до 500 МЕ/мл, от 10 МЕ/мл до 250 МЕ/мл, от 100 МЕ/мл до 500 МЕ/мл или от 100 МЕ/мл до 400 МЕ/мл. В конкретных вариантах осуществления композицию обогащенных Т-клеток культивируют с IL-2 в концентрации, составляющей или составляющей приблизительно 50 МЕ/мл, 75 МЕ/мл, 100 МЕ/мл, 125 МЕ/мл, 150 МЕ/мл, 175 МЕ/мл, 200 МЕ/мл, 225 МЕ/мл, 250 МЕ/мл, 300 МЕ/мл или 400 МЕ/мл. В некоторых вариантах осуществления композицию обогащенных Т-клеток культивируют с рекомбинантным IL-2 в концентрации 200 МЕ/мл. В некоторых вариантах осуществления композиция обогащенных Т-клеток является композицией обогащенных CD4+ Т-клеток, такой как композиция модифицированных CD4+ Т-клеток. В конкретных вариантах осуществления композиция обогащенных Т-клеток является композицией обогащенных CD8+ Т-клеток, такой как композиция модифицированных CD8+ Т-клеток.

[0327] В некоторых вариантах осуществления композицию обогащенных Т-клеток, таких как отдельные композиции модифицированных CD4+ Т-клеток и CD8+ Т-клеток, культивируют с IL-7, например, человеческим рекомбинантным IL-7, в концентрации от 10 МЕ/мл до 5000 МЕ/мл, от 500 МЕ/мл до 2000 МЕ/мл, от 600 МЕ/мл до 1500 МЕ/мл, от 500 МЕ/мл до 2500 МЕ/мл, от 750 МЕ/мл до 1,500 МЕ/мл или от 1000 МЕ/мл до 2000 МЕ/мл. В конкретных вариантах осуществления композицию обогащенных Т-клеток культивируют с IL-7 в концентрации, составляющей или составляющей приблизительно 100 МЕ/мл, 200 МЕ/мл, 300 МЕ/мл, 400 МЕ/мл, 500 МЕ/мл, 600 МЕ/мл, 700 МЕ/мл, 800 МЕ/мл, 900 МЕ/мл, 1000 МЕ/мл, 1200 МЕ/мл, 1400 МЕ/мл или 1600 МЕ/мл. В некоторых вариантах осуществления клетки культивируют в присутствии рекомбинантного IL-7 в концентрации 1200 МЕ/мл или приблизительно 1200 МЕ/мл. В некоторых вариантах осуществления композиция обогащенных Т-клеток является композицией обогащенных CD4+ Т-клеток, таких как модифицированные CD4+ Т-клетки.

[0328] В некоторых вариантах осуществления композицию обогащенных Т-клеток, таких как отдельные композиции модифицированных CD4+ Т-клеток и CD8+ Т-клеток, культивируют с IL-15, например, человеческим рекомбинантным IL-15, в концентрации от

0,1 МЕ/мл до 200 МЕ/мл, от 1 МЕ/мл до 50 МЕ/мл, от 5 МЕ/мл до 25 МЕ/мл, от 25 МЕ/мл до 50МЕ/мл, от 5 МЕ/мл до 15 МЕ/мл или от 10 МЕ/мл до 00 МЕ/мл. В конкретных вариантах осуществления композицию обогащенных Т-клеток культивируют с ИЛ-15 в концентрации, составляющей или составляющей приблизительно 1 МЕ/мл, 2 МЕ/мл, 3 МЕ/мл, 4 МЕ/мл, 5 МЕ/мл, 6 МЕ/мл, 7 МЕ/мл, 8 МЕ/мл, 9 МЕ/мл, 10 МЕ/мл, 11 МЕ/мл, 12 МЕ/мл, 13 МЕ/мл, 14 МЕ/мл, 15 МЕ/мл, 20 МЕ/мл, 25 МЕ/мл, 30 МЕ/мл, 40 МЕ/мл, 50 МЕ/мл, 100 МЕ/мл или 200 МЕ/мл. В конкретных вариантах осуществления композицию обогащенных Т-клеток культивируют с рекомбинантным ИЛ-15 в концентрации 20 МЕ/мл. В некоторых вариантах осуществления композиция обогащенных Т-клеток является композицией обогащенных CD4<sup>+</sup> Т-клеток, таких как модифицированные CD4<sup>+</sup> Т-клетки. В конкретных вариантах осуществления композиция обогащенных Т-клеток является композицией обогащенных CD8<sup>+</sup> Т-клеток, таких как модифицированные CD8<sup>+</sup> Т-клетки.

[0329] В конкретных вариантах осуществления композицию обогащенных CD8<sup>+</sup> Т-клеток, таких как модифицированные CD8<sup>+</sup> Т-клетки, культивируют в присутствии ИЛ-2 и/или ИЛ-15, например, в описанных количествах. В некоторых вариантах осуществления композицию обогащенных CD4<sup>+</sup> Т-клеток, таких как модифицированные CD4<sup>+</sup> Т-клетки, культивируют в присутствии ИЛ-2, ИЛ-7 и/или ИЛ-15, например, в описанных количествах. В некоторых вариантах осуществления ИЛ-2, ИЛ-7 и/или ИЛ-15 являются рекомбинантными. В некоторых вариантах осуществления ИЛ-2, ИЛ-7 и/или ИЛ-15 являются человеческими. В конкретных вариантах осуществления, один или более цитокинов представляют собой или включают человеческий рекомбинантный ИЛ-2, ИЛ-7 и/или ИЛ-15.

[0330] В конкретных вариантах осуществления культивирование проводят в закрытой системе. В некоторых вариантах осуществления культивирование проводят в закрытой системе в стерильных условиях. В конкретных вариантах осуществления культивирование проводят в той же закрытой системе, как и один или более этапов предложенных систем. В некоторых вариантах осуществления композицию обогащенных Т-клеток удаляют из закрытой системы и помещают в и/или соединяют с биореактором для культивирования. Примеры подходящих биореакторов для культивирования включают, без ограничения перечисленными, GE Xuri W25, GE Xuri W5, Sartorius BioSTAT RM 20/50, системы Finesse SmartRocker Bioreactor и системы Pall XRS Bioreactor. В некоторых вариантах осуществления биореактор используют чтобы перфузии и/или смешивания клеток в течение по меньшей мере части этапа культивирования.

[0331] В некоторых вариантах осуществления клетки, культивируемые в закрытом состоянии, связанными с и/или под контролем биореактора, подвергаются размножению во время культивирования быстрее, чем клетки, культивируемые без биореактора, например, клетки, культивируемые при статических условиях, например, без перемешивания, качания, движения и/или перфузии. В некоторых вариантах осуществления клетки, культивируемые в закрытом состоянии, связанными с и/или под контролем биореактора, достигают порогового размножения, количества клеток и/или

плотности в течение 14 дней, 10 дней, 9 дней, 8 дней, 7 дней, 6 дней, 5 дней, 4 дней, 3 дней, 2 дней, 60 часов, 48 часов, 36 часов, 24 часов или 12 часов. В некоторых вариантах осуществления клетки, культивируемые в закрытом состоянии, связанными с и/или под контролем биореактора, достигают порогового размножения, количества клеток и/или плотности по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 100%, по меньшей мере на 150%, по меньшей мере в 1 раз, по меньшей мере в 2 раза, по меньшей мере в 3 раза, по меньшей мере в 4 раза, по меньшей мере в 5 раз больше, чем клетки, культивированные в примерном и/или альтернативном процессе, где клетки не культивируют в закрытом состоянии, связанными с и/или под контролем биореактора.

[0332] В некоторых вариантах осуществления смешивание представляет собой или включает качание и/или движение. В некоторых случаях биореактор может подвергаться движению или качанию, которое, в некоторых аспектах, может увеличить перенос кислорода. Приведение биореактора в движение может включать, без ограничения перечисленным, вращение вдоль горизонтальной оси, вращение вдоль вертикальной оси, качание вдоль наклонной или наклоненной горизонтальной оси биореактора или их любую комбинацию. В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере, часть инкубирования проводят с качанием. Скорость качания и угол качания могут регулировать так, чтобы достигнуть требуемого перемешивания. В некоторых вариантах осуществления угол качания составляет 20°, 19°, 18°, 17°, 16°, 15°, 14°, 13°, 12°, 11°, 10°, 9°, 8°, 7°, 6°, 5°, 4°, 3°, 2° или 1°. В некоторых вариантах осуществления угол качания составляет 6-16°. В других вариантах осуществления угол качания составляет 7-16°. В других вариантах осуществления угол качания составляет 8-12°. В некоторых вариантах осуществления скорость качания составляет 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40 об/мин. В некоторых вариантах осуществления скорость качания составляет от 4 до 12 об/мин, например, от 4 до 6 об/мин, включительно.

[0333] В некоторых вариантах осуществления биореактор поддерживает температуру 37°C или около 37°C и уровни CO<sub>2</sub> 5% или около 5% при скорости стационарного потока воздуха, составляющей, составляющей приблизительно или по меньшей мере 0,01 л/мин, 0,05 л/мин, 0,1 л/мин, 0,2 л/мин, 0,3 л/мин, 0,4 л/мин, 0,5 л/мин, 1,0 л/мин, 1,5 л/мин или 2,0 л/мин или больше чем 2,0 л/мин. В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере, часть культивирования проводят с перфузией, такой как со скоростью 290 мл/день, 580 мл/день и/или 1160 мл/день, например, в зависимости от времени относительно начала культивирования и/или от плотности культивируемых клеток. В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере, часть экспансии клеточной культуры проводят с качающим движением, таким как под углом от 5° до 10°, таким как 6°, при постоянной скорости качания, такой как скорость от 5 до 15 об/мин, такая как 6 об/мин или 10 об/мин.

[0334] В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере часть этапа культивирования проводят при постоянной перфузии, например, перфузии с низкой постоянной скоростью. В некоторых вариантах осуществления перфузия представляет собой или включает выпуск жидкости, например, использованных сред, и подачу свежих сред. В некоторых вариантах осуществления перфузия заменяет использованные среды свежими средами. В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере, часть культивирования проводят при перфузии с постоянной скоростью, составляющей или составляющей приблизительно или по меньшей мере 100 мл/день, 200 мл/день, 250 мл/день, 275 мл/день, 290 мл/день, 300 мл/день, 350 мл/день, 400 мл/день, 450 мл/день, 500 мл/день, 550 мл/день, 575 мл/день, 580 мл/день, 600 мл/день, 650 мл/день, 700 мл/день, 750 мл/день, 800 мл/день, 850 мл/день, 900 мл/день, 950 мл/день, 1000 мл/день, 1100 мл/день, 1160 мл/день, 1200 мл/день, 1400 мл/день, 1600 мл/день, 1800 мл/день, 2000 мл/день, 2200 мл/день или 2400 мл/день.

[0335] В конкретных вариантах осуществления культивирование начинают в условиях без перфузии, а перфузию начинают по истечении установленного и/или заданного промежутка времени, такого как через или через приблизительно или по меньшей мере 12 часов, 24 часа, 36 часов, 48 часов, 60 часов, 72 часа или больше 72 часов после начала или инициирования культивирования. В конкретных вариантах осуществления перфузию начинают, когда плотность или концентрация клеток достигает установленной или заданной плотности или концентрации. В некоторых вариантах осуществления перфузию начинают, когда культивируемые клетки достигают плотности или концентрации, равной, равной приблизительно или по меньшей мере  $0,1 \times 10^6$  клеток/мл,  $0,2 \times 10^6$  клеток/мл,  $0,4 \times 10^6$  клеток/мл,  $0,6 \times 10^6$  клеток/мл,  $0,8 \times 10^6$  клеток/мл,  $1 \times 10^6$  клеток/мл,  $1,2 \times 10^6$  клеток/мл,  $1,4 \times 10^6$  клеток/мл,  $1,6 \times 10^6$  клеток/мл,  $1,8 \times 10^6$  клеток/мл,  $2,0 \times 10^6$  клеток/мл,  $2,5 \times 10^6$  клеток/мл,  $3,0 \times 10^6$  клеток/мл,  $3,5 \times 10^6$  клеток/мл,  $4,0 \times 10^6$  клеток/мл,  $4,5 \times 10^6$  клеток/мл,  $5,0 \times 10^6$  клеток/мл,  $6 \times 10^6$  клеток/мл,  $8 \times 10^6$  клеток/мл или  $10 \times 10^6$  клеток/мл. В конкретных вариантах осуществления перфузию начинают, когда плотность или концентрация жизнеспособных клеток достигает установленной или заданной плотности или концентрации. В некоторых вариантах осуществления перфузию начинают, когда культивируемые жизнеспособные клетки достигают плотности или концентрации, равной, равной приблизительно или по меньшей мере  $0,1 \times 10^6$  жизнеспособных клеток/мл,  $0,2 \times 10^6$  жизнеспособных клеток/мл,  $0,4 \times 10^6$  жизнеспособных клеток/мл,  $0,6 \times 10^6$  жизнеспособных клеток/мл,  $0,8 \times 10^6$  жизнеспособных клеток/мл,  $1 \times 10^6$  жизнеспособных клеток/мл,  $1,2 \times 10^6$  жизнеспособных клеток/мл,  $1,4 \times 10^6$  жизнеспособных клеток/мл,  $1,6 \times 10^6$  жизнеспособных клеток/мл,  $1,8 \times 10^6$  жизнеспособных клеток/мл,  $2,0 \times 10^6$  жизнеспособных клеток/мл,  $2,5 \times 10^6$  жизнеспособных клеток/мл,  $3,0 \times 10^6$  жизнеспособных клеток/мл,  $3,5 \times 10^6$  жизнеспособных клеток/мл,  $4,0 \times 10^6$  жизнеспособных клеток/мл,  $4,5 \times 10^6$  жизнеспособных клеток/мл,  $5,0 \times 10^6$  жизнеспособных клеток/мл,  $6 \times 10^6$  жизнеспособных клеток/мл,  $8 \times 10^6$  жизнеспособных клеток/мл или  $10 \times 10^6$  жизнеспособных клеток/мл.

[0336] В конкретных вариантах осуществления перфузию во время культивирования проводят с разной скоростью. Например, в некоторых вариантах осуществления скорость перфузии зависит от плотности и/или концентрации культивируемых клеток. В некоторых вариантах осуществления скорость перфузии увеличивают, когда клетки достигают установленной или заданной плотности или концентрации. Скорость перфузии может изменяться, например, изменяться от одной постоянной скорости перфузии до повышенной постоянной скорости перфузии, один раз, два раза, три раза, четыре раза, пять раз, больше пяти раз, больше десяти раз, больше 15 раз, больше 20 раз, больше 25 раз, больше 50 раз или больше 100 раз во время культивирования. В некоторых вариантах осуществления постоянную скорость перфузии повышают, когда клетки достигают установленной или заданной плотности или концентрации клеток, составляющей, составляющей приблизительно или по меньшей мере  $0,6 \times 10^6$  клеток/мл,  $0,8 \times 10^6$  клеток/мл,  $1 \times 10^6$  клеток/мл,  $1,2 \times 10^6$  клеток/мл,  $1,4 \times 10^6$  клеток/мл,  $1,6 \times 10^6$  клеток/мл,  $1,8 \times 10^6$  клеток/мл,  $2,0 \times 10^6$  клеток/мл,  $2,5 \times 10^6$  клеток/мл,  $3,0 \times 10^6$  клеток/мл,  $3,5 \times 10^6$  клеток/мл,  $4,0 \times 10^6$  клеток/мл,  $4,5 \times 10^6$  клеток/мл,  $5,0 \times 10^6$  клеток/мл,  $6 \times 10^6$  клеток/мл,  $8 \times 10^6$  клеток/мл или  $10 \times 10^6$  клеток/мл. В некоторых вариантах осуществления постоянную скорость перфузии повышают, когда клетки достигают установленной или заданной плотности или концентрации жизнеспособных клеток, составляющей, составляющей приблизительно или по меньшей мере  $0,6 \times 10^6$  жизнеспособных клеток/мл,  $0,8 \times 10^6$  жизнеспособных клеток/мл,  $1 \times 10^6$  жизнеспособных клеток/мл,  $1,2 \times 10^6$  жизнеспособных клеток/мл,  $1,4 \times 10^6$  жизнеспособных клеток/мл,  $1,6 \times 10^6$  жизнеспособных клеток/мл,  $1,8 \times 10^6$  жизнеспособных клеток/мл,  $2,0 \times 10^6$  жизнеспособных клеток/мл,  $2,5 \times 10^6$  жизнеспособных клеток/мл,  $3,0 \times 10^6$  жизнеспособных клеток/мл,  $3,5 \times 10^6$  жизнеспособных клеток/мл,  $4,0 \times 10^6$  жизнеспособных клеток/мл,  $4,5 \times 10^6$  жизнеспособных клеток/мл,  $5,0 \times 10^6$  жизнеспособных клеток/мл,  $6 \times 10^6$  жизнеспособных клеток/мл,  $8 \times 10^6$  жизнеспособных клеток/мл или  $10 \times 10^6$  жизнеспособных клеток/мл. В некоторых вариантах осуществления плотность и/или концентрация клеток или жизнеспособных клеток во время культивирования, например, при перфузии, могут определять или контролировать, например, при использовании описанных методов, включая оптические методы, в том числе цифровой голографической микроскопии (DHM) или дифференциальной цифровой голографической микроскопии (DDHM).

[0337] В некоторых вариантах осуществления культивирование начинают при условиях без перфузии, а перфузию начинают, когда плотность или концентрация клеток достигают установленной или заданной плотности или концентрации. В некоторых вариантах осуществления перфузию начинают со скоростью, составляющей, составляющей приблизительно или по меньшей мере 100 мл/день, 200 мл/день, 250 мл/день, 275 мл/день, 290 мл/день, 300 мл/день, 350 мл/день, 400 мл/день, 450 мл/день, 500 мл/день, 550 мл/день, 575 мл/день, 580 мл/день, 600 мл/день, 650 мл/день, 700 мл/день, 750 мл/день, 800 мл/день, 850 мл/день, 900 мл/день, 950 мл/день, 1000 мл/день, 1100 мл/день,

1160 мл/день, 1200 мл/день, 1400 мл/день, 1600 мл/день, 1800 мл/день, 2000 мл/день, 2200 мл/день или 2400 мл/день, когда плотность или концентрация клеток достигают установленной или заданной плотности или концентрации. В некоторых вариантах осуществления перфузию начинают, когда культивируемые клетки или культивируемые жизнеспособные клетки достигают плотности или концентрации, составляющей, составляющей приблизительно или по меньшей мере  $0,1 \times 10^6$  клеток/мл,  $0,2 \times 10^6$  клеток/мл,  $0,4 \times 10^6$  клеток/мл,  $0,6 \times 10^6$  клеток/мл,  $0,8 \times 10^6$  клеток/мл,  $1 \times 10^6$  клеток/мл,  $1,2 \times 10^6$  клеток/мл,  $1,4 \times 10^6$  клеток/мл,  $1,6 \times 10^6$  клеток/мл,  $1,8 \times 10^6$  клеток/мл,  $2,0 \times 10^6$  клеток/мл,  $2,5 \times 10^6$  клеток/мл,  $3,0 \times 10^6$  клеток/мл,  $3,5 \times 10^6$  клеток/мл,  $4,0 \times 10^6$  клеток/мл,  $4,5 \times 10^6$  клеток/мл,  $5,0 \times 10^6$  клеток/мл,  $6 \times 10^6$  клеток/мл,  $8 \times 10^6$  клеток/мл или  $10 \times 10^6$  клеток/мл.

[0338] В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере, часть культивирования проводят при перфузии с определенной скоростью, и скорость перфузии повышают до скорости, составляющей, составляющей приблизительно или по меньшей мере до 100 мл/день, 200 мл/день, 250 мл/день, 275 мл/день, 290 мл/день, 300 мл/день, 350 мл/день, 400 мл/день, 450 мл/день, 500 мл/день, 550 мл/день, 575 мл/день, 580 мл/день, 600 мл/день, 650 мл/день, 700 мл/день, 750 мл/день, 800 мл/день, 850 мл/день, 900 мл/день, 950 мл/день, 1000 мл/день, 1100 мл/день, 1160 мл/день, 1200 мл/день, 1400 мл/день, 1600 мл/день, 1800 мл/день, 2000 мл/день, 2200 мл/день или 2400 мл/день, когда плотность или концентрация клеток достигают установленной или заданной плотности или концентрации. В некоторых вариантах осуществления перфузию начинают, когда культивируемые клетки или культивируемые жизнеспособные клетки достигают плотности или концентрации, составляющей, составляющей приблизительно или по меньшей мере  $0,1 \times 10^6$  клеток/мл,  $0,2 \times 10^6$  клеток/мл,  $0,4 \times 10^6$  клеток/мл,  $0,6 \times 10^6$  клеток/мл,  $0,8 \times 10^6$  клеток/мл,  $1 \times 10^6$  клеток/мл,  $1,2 \times 10^6$  клеток/мл,  $1,4 \times 10^6$  клеток/мл,  $1,6 \times 10^6$  клеток/мл,  $1,8 \times 10^6$  клеток/мл,  $2,0 \times 10^6$  клеток/мл,  $2,5 \times 10^6$  клеток/мл,  $3,0 \times 10^6$  клеток/мл,  $3,5 \times 10^6$  клеток/мл,  $4,0 \times 10^6$  клеток/мл,  $4,5 \times 10^6$  клеток/мл,  $5,0 \times 10^6$  клеток/мл,  $6 \times 10^6$  клеток/мл,  $8 \times 10^6$  клеток/мл или  $10 \times 10^6$  клеток/мл. В некоторых вариантах осуществления перфузию проводят, когда клетки культивируют в объеме, составляющем, составляющем приблизительно или по меньшей мере 300 мл, 400 мл, 500 мл, 600 мл, 700 мл, 800 мл, 900 мл или 1000 мл. В некоторых вариантах осуществления объем составляет 1000 мл.

[0339] В некоторых вариантах осуществления культивирование начинают при условиях либо без перфузии, либо при перфузии с определенной скоростью, при этом скорость перфузии повышают до скорости, составляющей, составляющей приблизительно или на уровне 290 мл/день, когда плотность или концентрация клеток достигают концентрации, составляющей, составляющей приблизительно или по меньшей мере  $0,61 \times 10^6$  клеток/мл. В некоторых вариантах осуществления клетки перфузируют со скоростью, составляющей, составляющей приблизительно или по меньшей мере 290 мл/день, когда плотность или концентрация клеток достигают концентрации, составляющей, составляющей приблизительно или по меньшей мере  $0,61 \times 10^6$  клеток/мл,

когда клетки культивируют в объеме, составляющем, составляющем приблизительно или по меньшей мере 1000 мл. В некоторых вариантах осуществления скорость перфузии повышают до скорости, составляющей, составляющей приблизительно или на уровне 580 мл/день, когда плотность или концентрация клеток достигают концентрации, составляющей, составляющей приблизительно или по меньшей мере  $0,81 \times 10^6$  клеток/мл. В некоторых вариантах осуществления скорость перфузии повышают до скорости, составляющей, составляющей приблизительно или на уровне 1160 мл/день, когда плотность или концентрация клеток достигают концентрации, составляющей, составляющей приблизительно или по меньшей мере  $1,01 \times 10^6$  клеток/мл. В некоторых вариантах осуществления скорость перфузии повышают до скорости, составляющей, составляющей приблизительно или на уровне 1160 мл/день, когда плотность или концентрация клеток достигают концентрации, составляющей, составляющей приблизительно или по меньшей мере  $1,2 \times 10^6$  клеток/мл.

[0340] В аспектах предложенных вариантов осуществления скорость перфузии, включая установку времени, когда она начинается или увеличивается, как описано в настоящем документе и выше, определяют при оценке плотности и/или концентрации клеток или оценке плотности и/или концентрации жизнеспособных клеток во время культивирования. В некоторых вариантах осуществления плотность и/или концентрацию клеток могут определять при использовании описанных методов, включая оптические методы, в том числе цифровой голографической микроскопии (DHM) или дифференциальной цифровой голографической микроскопии (DDHM).

[0341] В некоторых вариантах осуществления композицию обогащенных клеток, таких как модифицированные Т-клетки, например, модифицированные CD4+ Т-клетки или модифицированные CD8+ Т-клетки, культивируют в присутствии поверхностно-активного вещества. В конкретных вариантах осуществления культивирование клеток композиции уменьшает величину напряжения сдвига, которое может появляться во время культивирования, например, из-за перемешивания, качания, движения и/или перфузии. В конкретных вариантах осуществления композицию обогащенных Т-клеток, таких как модифицированные Т-клетки, например, модифицированные CD4+ Т-клетки или модифицированные CD8+ Т-клетки, культивируют с поверхностно-активным веществом, при этом остается по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 99% или по меньшей мере 99,9% живых Т-клеток, например, жизнеспособных и/или не подвергшихся некрозу, программируемой гибели клеток или апоптозу, в течение или через по меньшей мере 1 день, 2 дня, 3 дня, 4 дня, 5 дней, 6 дней, 7 дней или больше 7 дней после завершения культивирования. В конкретных вариантах осуществления композицию обогащенных Т-клеток, таких как модифицированные Т-клетки, например, модифицированные CD4+ Т-клетки или модифицированные CD8+ Т-клетки, культивируют в присутствии поверхностно-активного вещества, при этом меньше 50%, меньше 40%, меньше 30%, меньше 25%,



меньше 20%, меньше 15%, меньше 10%, меньше 5%, меньше 1%, меньше 0,1% или меньше 0,01% клеток подвергаются гибели клеток, например, апоптозу, программируемой гибели клеток и/или некрозу, например, вследствие сдвига или вызванного сдвигом напряжения.

[0342] В конкретных вариантах осуществления композицию обогащенных Т-клеток, такие как модифицированные Т-клетки, например, модифицированные CD4<sup>+</sup> Т-клетки или модифицированные CD8<sup>+</sup> Т-клетки, культивируют в присутствии от 0,1 мкл/мл до 10,0 мкл/мл, от 0,2 мкл/мл до 2,5 мкл/мл, от 0,5 мкл/мл до 5 мкл/мл, от 1 мкл/мл до 3 мкл/мл или от 2 мкл/мл до 4 мкл/мл поверхностно-активного вещества. В некоторых вариантах осуществления композицию обогащенных Т-клеток, таких как модифицированные Т-клетки, например, модифицированные CD4<sup>+</sup> Т-клетки или модифицированные CD8<sup>+</sup> Т-клетки, культивируют в присутствии поверхностно-активного вещества в количестве, составляющем, составляющем приблизительно или по меньшей мере 0,1 мкл/мл, 0,2 мкл/мл, 0,4 мкл/мл, 0,6 мкл/мл, 0,8 мкл/мл, 1 мкл/мл, 1,5 мкл/мл, 2,0 мкл/мл, 2,5 мкл/мл, 5,0 мкл/мл, 10 мкл/мл, 25 мкл/мл или 50 мкл/мл. В некоторых вариантах осуществления композицию обогащенных Т-клеток культивируют в присутствии 2 мкл/мл или приблизительно 2 мкл/мл поверхностно-активного вещества.

[0343] В некоторых вариантах осуществления поверхностно-активное вещество представляет собой или включает вещество, снижающее поверхностное натяжение жидкостей и/или твердых веществ. Например, поверхностно-активное вещество включает жирный спирт (например, стеариловый спирт), полиоксиэтиленгликоль-октилфеноловый эфир (например, Triton X-100) или полиоксиэтиленгликоль сорбитан алкиловый сложный эфир (например, полисорбат 20, 40, 60). В некоторых вариантах осуществления поверхностно-активное вещество выбрано из группы, состоящей из полисорбата 80 (PS80), полисорбата 20 (PS20), полочсамера 188 (P188). В примере осуществления концентрация поверхностно-активного вещества в химически определенных питательных средах составляет от приблизительно 0,0025% до приблизительно 0,25% (об/об) PS80; от приблизительно 0,0025% до приблизительно 0,25% (об/об) PS20; или от приблизительно 0,1% до приблизительно 5,0% (в/об) P188.

[0344] В некоторых вариантах осуществления поверхностно-активное вещество представляет собой или включает анионное поверхностно-активное вещество, катионное поверхностно-активное вещество, цвиттер-ионное поверхностно-активное вещество или неионогенное поверхностно-активное вещество, добавленное к ним. Подходящие анионные поверхностно-активные вещества включают, без ограничения перечисленными, алкилсульфонаты, алкилфосфаты, алкилфосфонаты, лаурат калия, стеарат триэтаноламина, лаурилсульфат натрия, додецилсульфат натрия, алкил полиоксиэтилен сульфаты, альгинат натрия, диоктил сульфосукцинат натрия, фосфатидилглицерин, фосфатидилинозин, фосфатидилинозитол, дифосфатидилглицерин, фосфатидилсерин, фосфатидную кислоту и ее соли, натрий карбоксиметилцеллюлозу, холевую кислоту и другие желчные кислоты (например, холевую кислоту, дезоксихолевую кислоту,

гликохолевую кислоту, таурохолевую кислоту, гликодезоксихолевую кислоту) и их соли (например, дезоксихолат натрия).

[0345] В некоторых вариантах осуществления подходящие неионогенные поверхностно-активные вещества включают: глицерилловые сложные эфиры, эфиры полиоксиэтилен жирных спиртов, сложные эфиры полиоксиэтилен сорбитан жирных спиртов (полисорбаты), сложные эфиры полиоксиэтилен жирных кислоты, сложные эфиры сорбитана, моностеарат глицерина, полиэтиленгликоли, полипропиленгликоли, цетиловый спирт, цетостеариловый спирт, стеариловый спирт, арил алкил полиэфир спирты, сополимеры полиоксиэтилена-полиоксипропилена (полоксамеры), полоксамины, метилцеллюлозу, гидроксиметилцеллюлозу, гидроксипропилцеллюлозу, гидроксипропилметилцеллюлозу, некристаллическую целлюлозу, полисахариды, включая крахмал и производные крахмала, такие как гидроксипропилкрахмал (HES), поливиниловый спирт и поливинилпирролидон. В некоторых вариантах осуществления неионогенное поверхностно-активное вещество является сополимером полиоксиэтилена и полиоксипропилена и предпочтительно блоксополимером пропиленгликоля и этиленгликоля. Такие полимеры продаются под торговым наименованием ПОЛОКСАМЕР, и также иногда называются PLURONIC® F68 или Kolliphor® P188. Сложные эфиры полиоксиэтилен жирных кислот включают те, которые имеют короткие алкильные цепи. Одним из примеров такого поверхностно-активного вещества является SOLUTOL® HS 15, полиэтилен-660-гидроксистеарат.

[0346] В некоторых вариантах осуществления подходящие катионные поверхностно-активные вещества могут включать, без ограничения перечисленными, природные фосфолипиды, синтетические фосфолипиды, четвертичные соединения аммония, хлорид бензалкония, цетилтриметиламмонийбромид, хитозаны, лаурилдиметилбензиламмонийхлорид, ацилкарнитингидрохлориды, диметилдиооктадециламмонийбромид (DDAB), диолеилтриметиламмоний-пропан (DOTAP), димиристоилтриметиламмонийпропан (DMTAP), диметиламиноэтанкарбамоилхолестерин (DC-Chol), 1,2-диацилглицеро-3-(О-алкил)фосфохолин, О-алкилфосфатидилхолин, галогениды алкилпиридиния или длинноцепочечные алкиламины, такие как, например, n-октиламин и олеиламин.

[0347] Цвиттер-ионные поверхностно-активные вещества электрически нейтральны, но обладают локальными положительными и отрицательными зарядами в одной молекуле. Подходящие цвиттер-ионные поверхностно-активные вещества включают, без ограничения перечисленными, цвиттер-ионные фосфолипиды. Подходящие фосфолипиды включают фосфатидилхолин, фосфатидилэтанолламин, диацилглицеро-фосфоэтанолламин (такой как димиристоил-глицеро-фосфоэтанолламин (DMPE), дипальмитоил-глицеро-фосфоэтанолламин (DPPE), дистеароил-глицеро-фосфоэтанолламин (DSPE) и диолеил-глицеро-фосфоэтанолламин (DOPE)). В настоящем изобретении могут использоваться смеси фосфолипидов, включающие анионные и цвиттер-ионные фосфолипиды. Такие смеси включают, без ограничения перечисленными,

лизифосфолипиды, фосфолипид яйца или сои или их любую комбинацию. Фосфолипид, анионный, цвиттер-ионный или смесь фосфолипидов, может содержать соль или может быть обессолен, гидрогенизирован или частично гидрогенизирован, или может быть природным, полусинтетическим или синтетическим.

[0348] В некоторых вариантах осуществления поверхностно-активным веществом является полоксамер, например, Полоксамер 188. В некоторых вариантах осуществления композицию обогащенных Т-клеток культивируют в присутствии от 0,1 мкл/мл до 10,0 мкл/мл, от 0,2 мкл/мл до 2,5 мкл/мл, от 0,5 мкл/мл до 5 мкл/мл, от 1 мкл/мл до 3 мкл/мл или от 2 мкл/мл до 4 мкл/мл полоксамера. В некоторых вариантах осуществления композицию обогащенных Т-клеток культивируют в присутствии поверхностно-активного вещества в количестве, составляющем, составляющем приблизительно или по меньшей мере 0,1 мкл/мл, 0,2 мкл/мл, 0,4 мкл/мл, 0,6 мкл/мл, 0,8 мкл/мл, 1 мкл/мл, 1,5 мкл/мл, 2,0 мкл/мл, 2,5 мкл/мл, 5,0 мкл/мл, 10 мкл/мл, 25 мкл/мл или 50 мкл/мл. В некоторых вариантах осуществления композицию обогащенных Т-клеток культивируют в присутствии 2 мкл/мл или приблизительно 2 мкл/мл полоксамера.

[0349] В конкретных вариантах осуществления культивирование заканчивается, например, сбором клеток, когда клетки достигают порогового количества, концентрации и/или экспансии. В конкретных вариантах осуществления культивирование заканчивается, когда клетка достигает или достигает приблизительно или по меньшей мере 1,5-кратной экспансии, 2-кратной экспансии, 2,5-кратной экспансии, 3-кратной экспансии, 3,5-кратной экспансии, 4-кратной экспансии, 4,5-кратной экспансии, 5-кратной экспансии, 6-кратной экспансии, 7-кратной экспансии, 8-кратной экспансии, 9-кратной экспансии, 10-кратной экспансии или больше чем 10-кратной экспансии, например, в отношении и/или в сравнении с величиной плотности клеток в начале или инициировании культивирования. В некоторых вариантах осуществления пороговая экспансия является 4-кратной экспансией, например, в отношении и/или в сравнении с величиной плотности клеток в начале или инициировании культивирования.

[0350] В некоторых вариантах осуществления культивирование заканчивается, например, сбором клеток, когда клетки достигают порогового общего количества клеток, например, порогового числа клеток. В некоторых вариантах осуществления культивирование заканчивается, когда клетки достигают порогового общего числа ядродержащих клеток (TNC). В некоторых вариантах осуществления культивирование заканчивается, когда клетки достигают порогового количества жизнеспособных клеток, например, порогового числа жизнеспособных клеток. В некоторых вариантах осуществления пороговое число клеток составляет или составляет приблизительно или по меньшей мере  $50 \times 10^6$  клеток,  $100 \times 10^6$  клеток,  $200 \times 10^6$  клеток,  $300 \times 10^6$  клеток,  $400 \times 10^6$  клеток,  $600 \times 10^6$  клеток,  $800 \times 10^6$  клеток,  $1000 \times 10^6$  клеток,  $1200 \times 10^6$  клеток,  $1400 \times 10^6$  клеток,  $1600 \times 10^6$  клеток,  $1800 \times 10^6$  клеток,  $2000 \times 10^6$  клеток,  $2500 \times 10^6$  клеток,  $3000 \times 10^6$  клеток,  $4000 \times 10^6$  клеток,  $5000 \times 10^6$  клеток,  $10000 \times 10^6$  клеток,  $12000 \times 10^6$  клеток,  $15000 \times 10^6$  клеток или  $20000 \times 10^6$  клеток или любое предшествующее пороговое число

жизнеспособных клеток. В конкретных вариантах осуществления культивирование заканчивается, когда клетки достигают порогового числа клеток. В некоторых вариантах осуществления культивирование заканчивается через, приблизительно через или в течение 6 часов, 12 часов, 24 часов, 36 часов, 1 дня, 2 дней, 3 дней, 4 дней, 5 дней, 6 дней или 7 или больше дней, после достижения порогового числа клеток. В конкретных вариантах осуществления культивирование заканчивают в течение или через приблизительно 1 день после достижения порогового числа клеток. В некоторых вариантах осуществления пороговая плотность составляет, составляет приблизительно или составляет по меньшей мере  $0,1 \times 10^6$  клеток/мл,  $0,5 \times 10^6$  клеток/мл,  $1 \times 10^6$  клеток/мл,  $1,2 \times 10^6$  клеток/мл,  $1,5 \times 10^6$  клеток/мл,  $1,6 \times 10^6$  клеток/мл,  $1,8 \times 10^6$  клеток/мл,  $2,0 \times 10^6$  клеток/мл,  $2,5 \times 10^6$  клеток/мл,  $3,0 \times 10^6$  клеток/мл,  $3,5 \times 10^6$  клеток/мл,  $4,0 \times 10^6$  клеток/мл,  $4,5 \times 10^6$  клеток/мл,  $5,0 \times 10^6$  клеток/мл,  $6 \times 10^6$  клеток/мл,  $8 \times 10^6$  клеток/мл или  $10 \times 10^6$  клеток/мл или любое предыдущее пороговое значение для жизнеспособных клеток. В конкретных вариантах осуществления культивирование заканчивается, когда клетки достигают пороговой плотности. В некоторых вариантах осуществления культивирование заканчивается через, через приблизительно или в течение 6 часов, 12 часов, 24 часов, 36 часов, 1 дня, 2 дней, 3 дней, 4 дней, 5 дней, 6 дней или 7 или больше дней после достижения пороговой плотности. В конкретных вариантах осуществления культивирование заканчивают в течение или через приблизительно 1 день после достижения пороговой плотности.

[0351] В некоторых вариантах осуществления этап культивирования проводят в течение периода времени, требуемого для достижения клетками порогового количества, плотности и/или экспансии. В некоторых вариантах осуществления культивирование проводят в течение или в течение приблизительно или в течение меньше чем 6 часов, 12 часов, 18 часов, 24 часов, 36 часов, 48 часов, 60 часов, 72 часов, 2 дней, 3 дней, 4 дня, 5 дней, 6 дней, 7 дней, 7 дней, 8 дней, 9 дней, 10 дней, 1 неделя, 2 недель, 3 недель или 4 недель. В конкретных вариантах осуществления средний промежуток времени, требуемый, чтобы клетки множества отдельных композиций обогащенных Т-клеток, выделенных, обогащенных и/или отобранных из различных биологических образцов, достигли пороговой плотности, составляет, составляет приблизительно или меньше чем 6 часов, 12 часов, 18 часов, 24 часа, 36 часов, 48 часов, 60 часов, 72 часа, 2 дня, 3 дня, 4 дня, 5 дней, 6 дней, 7 дней, 7 дней, 8 дней, 9 дней, 10 дней, 1 неделю, 2 недели, 3 недели или 4 недели. В некоторых вариантах осуществления средний промежуток времени, требуемый, чтобы клетки множества отдельных композиций обогащенных Т-клеток, выделенных, обогащенных и/или отобранных из различных биологических образцов, достигли пороговой плотности, составляет, составляет приблизительно или меньше чем 6 часов, 12 часов, 18 часов, 24 часа, 36 часов, 48 часов, 60 часов, 72 часа, 2 дня, 3 дня, 4 дня, 5 дней, 6 дней, 7 дней, 7 дней, 8 дней, 9 дней, 10 дней, 1 неделю, 2 недели, 3 недели или 4 недели.

[0352] В некоторых вариантах осуществления этап культивирования проводят в течение минимум 4 дня, 5 дней, 6 дней, 7 дней, 7 дней, 8 дней, 9 дней или 10 дней и/или до



по меньшей мере минимального промежутка времени. В некоторых вариантах осуществления культивирование проводят в течение по меньшей мере 14 дней, по меньшей мере 12 дней, по меньшей мере 10 дней, по меньшей мере 7 дней, по меньшей мере 6 дней, по меньшей мере 5 дней, по меньшей мере 4 дней, по меньшей мере 3 дней, по меньшей мере 2 дней, по меньшей мере 36 часов, по меньшей мере 24 часов, по меньшей мере 12 часов или по меньшей мере 6 часов, даже если порог достигается до истечения минимального промежутка времени. В некоторых вариантах осуществления увеличение минимального промежутка времени, в течение которого проводят культивирование, может, в некоторых случаях, уменьшать активацию и/или снижать уровень одного или более маркеров активации в культивируемых клетках, клетках в готовом составе и/или клетках готовой композиции. В некоторых вариантах осуществления минимальное время культивирования отсчитывают от определенной точки в примерном процессе (например, этапа отбора; этапа рахморазживания; и/или этапа активации) до дня сбора клеток.

[0354] В аспектах предложенных вариантов осуществления, плотность и/или концентрацию клеток или жизнеспособных клеток во время культивирования контролируют или проверяют во время культивирования, например, пока не будет достигнуто пороговое количество, плотность и/или экспансия, как описано. В некоторых вариантах осуществления такие способы включают способы, как описанные, включая оптические методы, включающие цифровую голографическую микроскопию (DHM) или дифференциальную цифровую голографическую микроскопию (DDHM).

[0355] В некоторых вариантах осуществления культивируемые клетки являются готовыми клетками. В некоторых вариантах осуществления композиция обогащенных Т-клеток, таких как модифицированные Т-клетки, которые культивировали, является готовой композицией обогащенных Т-клеток. В конкретных вариантах осуществления CD4+ Т-клетки и/или CD8+ Т-клетки, которые культивировали, являются готовыми CD4+ и/или CD8+ Т-клетками. В конкретных вариантах осуществления композиция обогащенных CD4+ Т-клеток, таких как модифицированные CD4+ Т-клетки, которые культивировали, является готовой композицией обогащенных CD4+ Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления композиция обогащенных CD8+ Т-клеток, таких как модифицированные CD8+ Т-клетки, которые культивировали, является готовой композицией обогащенных CD8+ Т-клеток.

[0356] В некоторых вариантах осуществления клетки культивируют в условиях, которые вызывают пролиферацию и/или размножение в присутствии одного или более цитокинов. В конкретных вариантах осуществления, по меньшей мере, часть культивирования проводят с постоянным перемешиванием и/или перфузией, такими как перемешивание или перфузия, которыми управляет биореактор. В некоторых вариантах осуществления клетки культивируют в присутствии одного или более цитокинов и с поверхностно-активным веществом, например, полоксамером, таким как полоксамер 188, для уменьшения сдвига и/или напряжения сдвига при постоянном перемешивании и/или

перфузии. В некоторых вариантах осуществления композицию обогащенных CD4+ Т-клеток, таких как модифицированные CD4+ Т-клетки, культивируют в присутствии рекомбинантного IL-2, IL-7, IL-15 и полоксамера, где, по меньшей мере, часть культивирования проводят с постоянным перемешиванием и/или перфузией. В некоторых вариантах осуществления композицию обогащенных CD8+ Т-клеток, таких как модифицированные CD8+ Т-клетки, культивируют в присутствии рекомбинантного IL-2, IL-15 и полоксамера, где, по меньшей мере, часть культивирования проводят с постоянным перемешиванием и/или перфузией. В некоторых вариантах осуществления культивирование проводят, пока клетки не достигнут пороговой, по меньшей мере 4-кратной, экспансии, например, по сравнению с началом культивирования.

*Мониторинг клеток во время культивирования*

[0357] В некоторых вариантах осуществления клетки контролируют во время этапа культивирования. Контроль могут осуществлять, например, для установления (например, измерения, количественного определения) морфологии клеток, жизнеспособности клеток, гибели клеток и/или концентрации клеток (например, концентрации жизнеспособных клеток). В некоторых вариантах осуществления контроль осуществляется вручную, например, оператором-человеком. В некоторых вариантах осуществления контроль осуществляется автоматизированной системой. Автоматизированная система может требовать минимального или не требовать ручного ввода для контроля культивируемых клеток. В некоторых вариантах осуществления контроль выполняют как вручную, так и с помощью автоматизированной системы.

[0358] В некоторых вариантах осуществления клетки контролируют с помощью автоматизированной системы, не требующей ручного ввода. В некоторых вариантах осуществления автоматизированная система совместима с биореактором, например биореактором, описанным в настоящем документе, при этом клетки, подвергаемые культивированию, могут удалять из биореактора, контролировать и затем возвращать в биореактор. В некоторых вариантах осуществления контроль и культивирование происходит в конфигурации с замкнутым контуром. В некоторых аспектах, в конфигурации с замкнутым контуром, автоматизированная система и биореактор остаются стерильными. В вариантах осуществления автоматизированная система является стерильной. В некоторых вариантах осуществления автоматизированная система является поточной системой.

[0359] В некоторых вариантах осуществления автоматизированная система включает применение оптических методов (например, микроскопии) для определения морфологии клеток, жизнеспособности клеток, гибели клеток и/или концентрации клеток (например, концентрации жизнеспособных клеток). Любой оптический метод, подходящий для определения, например, особенностей, жизнеспособности и концентрации клеток, предусмотрен в настоящем документе. Неограничивающие примеры полезных оптических методов включают светлопольную микроскопию, флуоресцентную микроскопию, дифференциальную интерференционную контрастную

(DIC) микроскопию, фазово-контрастную микроскопию, цифровую голографическую микроскопию (DHM), дифференциальную цифровую голографическую микроскопию (DDHM) или их комбинацию. Дифференциальная цифровая голографическая микроскопия, DDHM и дифференциальная DHM могут использоваться в настоящем документе по мере необходимости. В некоторых вариантах осуществления автоматизированная система включает дифференциальный цифровой голографический микроскоп. В некоторых вариантах осуществления автоматизированная система включает дифференциальный цифровой голографический микроскоп, включающий средства подсветки (например, лазер, светодиод). Описания методики и применения DDHM можно найти, например, в US 7,362,449; EP 1,631,788; US 9,904,248; и US 9,684,281, которые включены в настоящий документ посредством ссылки во всей своей полноте.

[0360] DDHM обеспечивает неинвазивную визуализацию клеток без использования меток, что приводит к высококонтрастным голографическим изображениям. Изображения могут подвергаться сегментации объектов и дальнейшему анализу для получения множества морфологических признаков, которые количественно описывают визуализируемые объекты (например, культивируемые клетки, клеточный дебрис). Таким образом, различные признаки (например, морфологию клеток, жизнеспособность клеток, концентрацию клеток) могут непосредственно оценивать или вычислять с помощью DDHM при использовании, например, этапов получения изображений, обработки изображений, сегментации изображений и выделения признаков. В некоторых вариантах осуществления автоматизированная система включает в себя цифровое записывающее устройство для регистрации голографических изображений. В некоторых вариантах осуществления автоматизированная система включает в себя компьютер, включающий алгоритмы для анализа голографических изображений. В некоторых вариантах осуществления автоматизированная система включает в себя монитор и/или компьютер для отображения результатов анализа голографического изображения. В некоторых вариантах осуществления анализ является автоматизированным (то есть может выполняться при отсутствии пользовательского ввода). Пример подходящей автоматизированной системы для мониторинга клеток на этапе культивирования включает, без ограничения, Ovizio iLine F (Ovizio Imaging Systems NV/SA, Brussels, Belgium).

[0361] В некоторых вариантах осуществления мониторинг во время этапа культивирования осуществляют постоянно. В некоторых вариантах осуществления мониторинг осуществляют в режиме реального времени во время этапа культивирования. В некоторых вариантах осуществления мониторинг осуществляют в отдельных точках времени во время этапа культивирования. В некоторых вариантах осуществления мониторинг осуществляют по меньшей мере каждые 15 минут в течение всего этапа культивирования. В некоторых вариантах осуществления мониторинг осуществляют по меньшей мере каждые 30 минут в течение всего этапа культивирования. В некоторых вариантах осуществления мониторинг осуществляют по меньшей мере каждые 45 минут в





быть определены с помощью мониторинга, включающего использование оптических методов, таких как DHM или DDHM, включают жизнеспособность клеток, концентрацию клеток, количество клеток и/или плотность клеток. В некоторых вариантах осуществления жизнеспособность клеток характеризуют или определяют. В некоторых вариантах осуществления характеризуют или определяют концентрацию, плотность и/или количество клеток. В некоторых вариантах осуществления характеризуют или определяют концентрацию жизнеспособных клеток, количество жизнеспособных клеток и/или плотность жизнеспособных клеток. В некоторых вариантах осуществления культивируемые клетки контролируют с помощью автоматизированной системы, пока не будет достигнут порог экспансии, такой как описанный выше. В некоторых вариантах осуществления при достижении порога экспансии культивируемые клетки собирают, например, автоматическими или ручными методами, например, оператором-человеком. Порог экспансии может зависеть от общей концентрации, плотности и/или количества культивируемых клеток, определяемых автоматизированной системой. Также порог экспансии может зависеть от концентрации жизнеспособных, плотности и/или количества клеток.

[0363] В некоторых вариантах осуществления полученные клетки включают в состав, как описано, например, в присутствии фармацевтически приемлемого носителя. В некоторых вариантах осуществления полученные клетки включают в состав в присутствии криопротектора.

#### **Е. Включение клеток в состав**

[0364] В некоторых вариантах осуществления предложенные способы производства, создания или получения клеточной терапии и/или модифицированных клеток могут включать готовый состав клеток, такой как готовый состав генетически модифицированных клеток, полученных в предложенных этапах обработки до или после инкубирования, модификации и культивирования и/или одного или более других этапов обработки, как описано. В некоторых вариантах осуществления предложенные способы, связанные с изготовлением готового состава клеток, включают обработку, трансдуцированных клеток, таких как клетки, трансдуцированные и/или размноженные с применением этапов обработки, описанных выше, в закрытой системе. В некоторых вариантах осуществления доза клеток, включающих клетки, модифицированные рекомбинантным антигенным рецептором, например, CAR или TCR, предоставляют в виде композиции или состава, таких как фармацевтическая композиция или состав. Такие композиции могут применяться в соответствии с предложенными способами, например, при предупреждении или лечении заболеваний, состояний и нарушений, или в способах обнаружения, диагностики и прогнозирования.

[0365] В некоторых случаях клетки обрабатывают в одном или более этапах (например, проводимых в центрифужной камере и/или закрытой системе) для производства, создания или получения клеточной терапии, и/или модифицированные клетки могут включать изготовление состава клеток, таких как состав генетически

модифицированных клеток, полученный в предложенных этапах обработки путем трансдукции, до или после культивирования, например, культивирования и размножения, и/или одного или более других этапов обработки, как описано. В некоторых случаях клетки могут быть включены в состав в количестве для введения дозы, например, для введения единичной стандартной дозы или введения многократных доз. В некоторых вариантах осуществления предложенные способы, связанные с готовым составом клеток, включают обработку трансдуцированных клеток, таких как клетки, трансдуцированные и/или размноженные с применением этапов обработки, описанных выше, в закрытой системе.

[0366] В некоторых вариантах осуществления одну или более композиций обогащенных Т-клеток, таких как модифицированные и культивированные Т-клетки, например, готовые Т-клетки, включают в состав. В конкретных вариантах осуществления одну или более композиций обогащенных Т-клеток, таких как модифицированные и культивированные Т-клетки, например, готовые Т-клетки, включают в состав после того, как одну или более композиций модифицировали и/или культивировали. В конкретных вариантах осуществления одна или более композиций являются исходными композициями. В некоторых вариантах осуществления одна или более исходных композиций были ранее подвергнуты криозаморозке и хранению и разморожены перед инкубированием.

[0367] В некоторых вариантах осуществления одна или более композиций обогащенных Т-клеток, таких как модифицированные и культивированные Т-клетки, например, готовые Т-клетки, представляют собой или включают две отдельных композиции, например, отдельные модифицированные и/или культивированные композиции, обогащенных Т-клеток. В конкретных вариантах осуществления две отдельных композиции обогащенных Т-клеток, например, две отдельных композиции обогащенных CD4<sup>+</sup> Т-клеток и CD8<sup>+</sup> Т-клеток, отобранных, выделенных и/или обогащенных из одного и того же биологического образца, отдельно модифицированных и отдельно культивированных, включают в отдельные составы. В некоторых вариантах осуществления две отдельных композиции включают композицию обогащенных CD4<sup>+</sup> Т-клеток, такую как композицию модифицированных и/или культивированных CD4<sup>+</sup> Т-клеток. В конкретных вариантах осуществления две отдельных композиции включают композицию обогащенных CD8<sup>+</sup> Т-клеток, такую как композицию модифицированных и/или культивированных CD8<sup>+</sup> Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления две отдельных композиции обогащенных CD4<sup>+</sup> Т-клеток и обогащенных CD8<sup>+</sup> Т-клеток, такие как отдельные композиции модифицированных и культивированных CD4<sup>+</sup> Т-клеток и модифицированных и культивированных CD8<sup>+</sup> Т-клеток, включают в отдельные составы. В некоторых вариантах осуществления в состав включают одну композицию обогащенных Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления одна композиция является композицией обогащенных CD4<sup>+</sup> Т-клеток, такой как композиция модифицированных и/или культивированных CD4<sup>+</sup> Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления одна

композиция является композицией обогащенных CD4+ и CD8+ Т-клеток, объединенной из отдельных композиций перед включением в состав.

[0368] В некоторых вариантах осуществления отдельные композиции обогащенных CD4+ и CD8+ Т-клеток, таких как отдельные композиции модифицированных и культивированных CD4+ и CD8+ Т-клеток, объединяют в одну композицию и включают в состав. В некоторых вариантах осуществления отдельные составы композиций обогащенных CD4+ и обогащенных CD8+ Т-клеток объединяют в одну композицию после выполнения и/или завершения изготовления состава. В конкретных вариантах осуществления отдельные композиции обогащенных CD4+ и CD8+ Т-клеток, такие как отдельные композиции модифицированных и культивированных CD4+ и CD8+ Т-клеток, отдельно включают в состав в виде отдельных композиций.

[0369] В некоторых вариантах осуществления композиция обогащенных CD4+ Т-клеток, таких как модифицированные и культивированные CD4+ Т-клетки, например, готовые CD4+ Т-клетки, которые включены в состав, включает по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99%, по меньшей мере 99,5%, по меньшей мере 99,9% или 100% или приблизительно 100% CD4+ Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления композиция включает по меньшей мере 30%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99%, по меньшей мере 99,5%, по меньшей мере 99,9% или 100% или приблизительно 100% CD4+ Т-клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор и/или трансдуцированных или трансфицированных рекомбинантным полинуклеотидом. В некоторых вариантах осуществления композиция обогащенных CD4+ Т-клеток, таких как модифицированные и культивированные CD4+ Т-клетки, например, готовые CD4+ Т-клетки, который включены в состав, включают меньше 40%, меньше 35%, меньше 30%, меньше 25%, меньше 20%, меньше 15%, меньше 10%, меньше 5%, меньше 1%, меньше 0,1% или меньше 0,01% CD8+ Т-клеток, и/или не содержит CD8+ Т-клетки, и/или не содержит или по существу не содержит CD8+ Т-клетки.

[0370] В некоторых вариантах осуществления композиция обогащенных CD8+ Т-клеток, таких как модифицированные и культивированные CD8+ Т-клетки, например, готовые CD8+ Т-клетки, которые включены в состав, включает по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99%, по меньшей мере 99,5%, по меньшей мере 99,9% или 100% или приблизительно 100% CD8+ Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления композиция включает по меньшей мере 30%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99%, по

меньшей мере 99,5%, по меньшей мере 99,9% или 100% или приблизительно 100% CD8+ Т-клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор и/или трансдуцированных или трансфицированных рекомбинантным полинуклеотидом. В некоторых вариантах осуществления композиция обогащенных CD8+ Т-клеток, таких как модифицированные и культивированные CD8+ Т-клетки, например, готовые CD8+ Т-клетки, которые инкубируют при стимулирующих условиях, включает меньше 40%, меньше 35%, меньше 30%, меньше 25%, меньше 20%, меньше 15%, меньше 10%, меньше 5%, меньше 1%, меньше 0,1% или меньше 0,01% CD4+ Т-клеток, и/или не содержит CD4+ Т-клетки, и/или не содержит или по существу не содержит CD4+ Т-клетки.

[0371] В некоторых вариантах осуществления включенные в состав клетки являются готовыми клетками. В некоторых вариантах осуществления включенная в состав композиция обогащенных Т-клеток, такая как включенная в состав композиция модифицированных и культивированных Т-клеток, является готовой композицией обогащенных Т-клеток. В конкретных вариантах осуществления включенные в состав CD4+ Т-клетки и/или включенные в состав CD8+ Т-клетки являются готовыми CD4+ и/или CD8+ Т-клетками. В конкретных вариантах осуществления включенная в состав композиция обогащенных CD4+ Т-клеток является готовой композицией обогащенных CD4+ Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления включенная в состав композиция обогащенных CD8+ Т-клеток является готовой композицией обогащенных CD8+ Т-клеток.

[0372] В некоторых вариантах осуществления клетки могут быть включены в состав в контейнере, таком как мешок или флакон. В некоторых вариантах осуществления клетки включают в состав от 0 дней до 10 дней, от 0 до 5 дней, от 2 дней до 7 дней, от 0,5 дня до 4 дней или от 1 дня до 3 дней после того как клетки достигли порогового количества, плотности и/или экспансии клеток во время культивирования. В некоторых вариантах осуществления клетки включают в состав через или через приблизительно или в течение 12 часов, 18 часов, 24 часов, 1 дня, 2 дней или 3 дней после достижения порогового количества, плотности и/или экспансии клеток во время культивирования. В некоторых вариантах осуществления клетки включают в состав в течение или в течение приблизительно 1 дня после достижения порогового количества, плотности и/или экспансии клеток во время культивирования.

[0373] В конкретных вариантах осуществления предусмотрено, что клетки находятся в более активированном состоянии на ранних стадиях во время культивирования, чем на более поздних стадиях во время культивирования. Кроме того, в некоторых вариантах осуществления может быть предпочтительным включать в состав клетки, которые находятся в менее активированном состоянии, чем при пиковой активации, которая присутствует или может присутствовать во время культивирования. В некоторых вариантах осуществления клетки культивируют в течение минимального времени или промежутка времени, например, так, чтобы клетки были собраны в менее активированном состоянии, чем если бы они их включали в состав в более ранний момент

времени во время культивирования, независимо от того, когда достигнут порог. В некоторых вариантах осуществления клетки культивируют от 1 дня до 3 дней после достижения порогового количества, плотности и/или экспансии клеток во время культивирования. В некоторых вариантах осуществления клетки достигают порогового количества, плотности и/или экспансии клеток и остаются в культуре минимальное время или период до включения в состав. В некоторых вариантах осуществления клетки, достигнувшие порогового значения, не включают в состав, пока они не пробыли в культуре минимальное время и/или промежуток времени, такой как минимальное время или период от 1 дня до 14 дней, от 2 дней до 7 дней или от 3 дней до 6 дней, или минимальное время или продолжительность культивирования, составляющие или составляющие приблизительно 2 дня, 3 дня, 4 дня, 5 дней, 6 дней, 7 дней или больше 7 дней. В некоторых вариантах осуществления минимальное время или продолжительность культивирования составляет от 3 дней до 6 дней.

[0374] В некоторых вариантах осуществления клетки включают в состав в фармацевтически приемлемом буфере, который в некоторых аспектах может включать фармацевтически приемлемый носитель или вспомогательное вещество. В некоторых вариантах осуществления обработка включает замену среды средой или буфером для состава, который является фармацевтически приемлемым или требуемым для введения субъекту. В некоторых вариантах осуществления этапы обработки могут включать промывку трансдуцированных и/или размноженных клеток с заменой среды клеток фармацевтически приемлемым буфером, который может содержать один или более необязательных фармацевтически приемлемых носителей или вспомогательных веществ. Примерами таких фармацевтических форм, включающих фармацевтически приемлемые носители или вспомогательные вещества, может быть любая форма, описанная ниже, в сочетании с формами, приемлемыми для введения клеток и композиций субъекту. Фармацевтическая композиция в некоторых вариантах осуществления содержит клетки в количествах, эффективных для лечения или предупреждения заболевания или состояния, таких как терапевтически эффективное или профилактически эффективное количество.

[0375] "Фармацевтически приемлемый носитель" относится к компоненту в фармацевтическом составе, кроме активного ингредиента, который является нетоксичным для субъекта. Фармацевтически приемлемый носитель включает, без ограничения перечисленным, буфер, вспомогательное вещество, стабилизатор или консервант.

[0376] В некоторых аспектах выбор носителя частично определяется конкретной клеткой и/или способом введения. Таким образом, 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 смесь консервантов, как правило, присутствует в количестве от приблизительно 0,0001% до приблизительно 2% в расчете на общий вес композиции. Носители описаны, например, в Remington's Pharmaceutical Sciences 16th

edition, Osol, A. Ed. (1980). Фармацевтически приемлемые носители обычно нетоксичны для реципиентов в используемых дозах и концентрациях и включают, без ограничения перечисленным: буферы, такие как фосфат, цитрат и другие органические кислоты; антиоксиданты, в том числе аскорбиновую кислоту и метионин; консерванты (такие как октадецилдиметилбензиламмонийхлорид; хлорид гексаметония; хлорид бензалкония; хлорид бензетония; фенол, бутиловый спирт или бензиловый спирт; алкилпарабены, такие как метил или пропилпарабен; пирокатехин; резорцин; циклогексанол; 3-пентанол; и мета-крезол); полипептиды с низкой молекулярной массой (меньше чем приблизительно 10 остатков); 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 соединения, такие как ЭДТА; сахара, такие как сахарозу, маннит, трегалозу или сорбит; солеобразующие противоионы, такие как натрий; комплексные соединения металлов (например, Zn-белковые комплексы); и/или неионогенные поверхностно-активные вещества, такие как полиэтиленгликоль (ПЭГ).

[0377] Буферные вещества в некоторых аспектах включают в композиции. Подходящие буферные вещества включают, например, лимонную кислоту, цитрат натрия, фосфорную кислоту, фосфат калия и другие различные кислоты и соли. В некоторых аспектах используется смесь двух или более буферных веществ. Буферное вещество или смеси буферных веществ, как правило, присутствуют в количестве от приблизительно 0,001% до приблизительно 4% в расчете на общий вес композиции. Способы получения вводимых фармацевтических композиций известны. Примеры способов описаны более подробно, например, в Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Lippincott Williams & Wilkins; 21st ed. (May 1, 2005).

[0378] Составы могут включать водные растворы. Состав или композиция также может содержать больше одного активного ингредиента, применяемого при конкретном показании, заболевании или состоянии, которое лечат клетками, предпочтительно активные ингредиенты с действиями, совместимыми с клетками, где соответствующие действия не оказывают негативного влияния друг на друга. Такие активные ингредиенты соответственно присутствуют в комбинации в количествах, которые являются эффективными для предполагаемой цели. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция дополнительно включает другие фармацевтически активные вещества или средства, такие как химиотерапевтические средства, например, аспарагиназу, бусульфан, карбоплатин, цисплатин, даунорубицин, доксорубицин, фтороурацил, гмцитабин, гидроксимочевину, метотрексат, паклитаксел, ритуксимаб, винбластин и/или винкристин.

[0379] Композиции в некоторых вариантах осуществления 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 рН. Жидкие композиции могут включать носители, которые могут быть растворителем или дисперсионной средой, содержащей, например, воду, раствор хлорида натрия, фосфатно-солевой буфер, многоатомный спирт (например, глицерин, пропиленгликоль, жидкий полиэтиленгликоль) и их подходящие смеси. Стерильные растворы для инъекций могут быть приготовлены путем включения клеток в растворитель, например, в смеси с подходящим носителем, разбавителем или наполнителем, таким как стерильная вода, раствор хлорида натрия, глюкоза, декстроза и т.п. Композиции могут содержать вспомогательные вещества, такие как смачивающие, диспергирующие или эмульгирующие вещества (например, метилцеллюлозу), рН-буферные вещества, гелеобразующие или повышающие вязкость добавки, консерванты, вкусовые добавки и/или красители, в зависимости от требуемого пути введения и препарата. Для приготовления подходящих препаратов в некоторых аспектах можно обращаться к стандартным текстам.

[0380] Могут быть добавлены различные добавки, которые повышают стабильность и стерильность композиций, в том числе противомикробные консерванты, антиоксиданты, хелатообразующие соединения и буферы. Предотвращение действия микроорганизмов можно обеспечивать различными противобактериальными и противогрибковыми средствами, например, парабенами, хлорбутанолом, фенолом и сорбиновой кислотой. Пролонгированная абсорбция фармацевтической формы для инъекций может быть достигнута при использовании веществ, замедляющих абсорбцию, например, моностеарата алюминия и желатина.

[0381] В некоторых вариантах осуществления буфер для состава содержит криоконсервант. В некоторых вариантах осуществления клетку включают в состав с раствором криоконсерванта, содержащим от 1,0% до 30% раствора ДМСО, например, от 5% до 20% раствора ДМСО или от 5% до 10% раствора ДМСО. В некоторых вариантах осуществления раствор для криоконсервации представляет собой или содержит, например, PBS, содержащий 20% ДМСО и 8% человеческого сывороточного альбумина (ЧСА) или другие подходящие среды для замораживания клеток. В некоторых вариантах осуществления раствор криоконсерванта представляет собой или содержит, например, по меньшей мере или приблизительно 7,5% ДМСО. В некоторых вариантах осуществления этапы обработки могут включать промывку трансдуцированных и/или размноженных клеток для замены среды клеток раствором криоконсерванта. В некоторых вариантах осуществления клетки замораживают, например, подвергают криозаморозке или криоконсервации, в среде и/или растворе с конечной концентрацией ДМСО, равной или равной приблизительно 12,5%, 12,0%, 11,5%, 11,0%, 10,5%, 10,0%, 9,5%, 9,0%, 8,5%, 8,0%, 7,5%, 7,0%, 6,5%, 6,0%, 5,5% или 5,0%, или от 1% до 15%, от 6% до 12%, от 5% до 10% или от 6% до 8% ДМСО. В конкретных вариантах осуществления клетки замораживают, например, подвергают криозаморозке или криоконсервации, в среде и/или растворе с конечной концентрацией ЧСА, равной или равной приблизительно 5,0%, 4,5%, 4,0%, 3,5%, 3,0%, 2,5%, 2,0%, 1,5%, 1,25%, 1,0%, 0,75%, 0,5% или 0,25%, или от 0,1% до



5%, от 0,25% до 4%, от 0,5% до 2% или от 1% до 2% ЧСА.

[0382] В конкретных вариантах осуществления композиция обогащенных Т-клеток, например, Т-клеток, стимулированных, модифицированных и/или культивированных, включают в состав, подвергают криозаморозке, а затем хранению в течение некоторого промежутка времени. В некоторых вариантах осуществления включенные в состав, криозамороженные клетки хранят до выпуска клеток для инфузии. В конкретных вариантах осуществления включенные в состав криозамороженные клетки хранят в течение от 1 дня до 6 месяцев, от 1 месяца до 3 месяцев, от 1 дня до 14 дней, от 1 дня до 7 дней, от 3 дней до 6 дней, от 6 месяцев до 12 месяцев или дольше 12 месяцев. В некоторых вариантах осуществления клетки подвергают криозаморозке и хранению в течение, в течение приблизительно или меньше 1 дня, 2 дней, 3 дней, 4 дней, 5 дней, 6 дней или 7 дней. В некоторых вариантах осуществления клетки размораживают и вводят субъекту после хранения. В некоторых вариантах осуществления клетки хранят в течение или в течение приблизительно 5 дней.

[0383] В некоторых вариантах осуществления изготовление состава осуществляют при использовании одного или более этапов обработки, включая промывку, разбавление или концентрирование клеток, таких как культивированные или размноженные клетки. В некоторых вариантах осуществления обработка может включать разбавление или концентрирование клеток до нужной концентрации или количества, таких как композиции единичных лекарственных форм, включающих количество клеток для введения в данной дозе или ее дробной части. В некоторых вариантах осуществления этапы обработки могут включать уменьшение объема для увеличения, таким образом, концентрации клеток, при необходимости. В некоторых вариантах осуществления этапы обработки могут включать добавление объема для уменьшения, таким образом, концентрации клеток, при необходимости. В некоторых вариантах осуществления обработка включает добавление некоторого объема буфера для состава к трансдуцированным и/или размноженным клеткам. В некоторых вариантах осуществления объем буфера для состава составляет от 10 мл до 1000 мл или от приблизительно 10 мл до приблизительно 1000 мл, например, по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере или приблизительно 50 мл, 100 мл, 200 мл, 300 мл, 400 мл, 500 мл, 600 мл, 700 мл, 800 мл, 900 мл или 1000 мл.

[0384] В некоторых вариантах осуществления такие этапы обработки для включения композиции клеток в состав проводят в закрытой системе. Примеры таких этапов обработки могут быть выполнены с использованием центрифужной камеры в сочетании с одной или более системами или наборами, связанными с системой обработки клеток, такой как центрифужная камера, которую производит и продает Biosafe SA, включая камеры для использования с системами обработки клеток Serax® или Serax 2®. Примерная система и способ описаны в Международной публикации WO2016/073602. В некоторых вариантах осуществления способ включает осуществление вывода из внутренней полости центробежной камеры готового состава композиции, которая представляет собой готовую композицию клеток, включенную в буфер для состава, такой

как фармацевтически приемлемый буфер, в любом из описанных выше вариантов осуществления. В некоторых вариантах вывод включенной в состав композиции производят в контейнер, такой как флаконы сосудов для биомедицинского материала, описанных в настоящем документе, которые функционально связаны в качестве части закрытой системы с центробежной камерой. В некоторых вариантах осуществления сосуда из биомедицинского материала предназначены для интеграции и/или оперативного соединения, и/или интегрированы или оперативно связаны с закрытой системой или устройством, которое выполняет один или более этапов обработки. В некоторых вариантах осуществления сосуда для биомедицинского материала соединен с системой на выпускной линии или выпускном положении. В некоторых случаях закрытая система соединена с флаконом сосуда для биомедицинского материала на впускной трубе. Иллюстративные закрытые системы для применения с сосудами для биомедицинского материала, описанные в настоящем документе, включают системы Sepax® и Sepax® 2.

[0385] В некоторых вариантах осуществления закрытая система, такая как связанная с центрифужной камерой или системой обработки клеток, включает многопортовый выпускной набор, содержащий многоканальную магистраль, соединенную на каждом конце магистральной линии с портом, к которому может быть присоединен один или множество контейнеров для вывода готового состава композиции. В некоторых аспектах требуемое количество или множество флаконов может быть стерильно соединено с одним или более, обычно двумя или более, например, по меньшей мере 3, 4, 5, 6, 7, 8 или более портами многопортового выпуска. Например, в некоторых вариантах осуществления один или более контейнеров, например, сосудов для биомедицинских материалов, могут быть присоединены к портам, или не ко всем портам. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления система может обеспечивать выпуск готовой композиции во множество флаконов сосудов для биомедицинских материалов.

[0386] В некоторых аспектах клетки могут поступать в один или более из множества выпускных контейнеров, например, флаконов сосудов для биомедицинских материалов, в количестве для введения дозы, например, для введения однократной единичной дозы или для введения множества доз. Например, в некоторых вариантах осуществления каждый из флаконов сосудов для биомедицинских материалов может содержать количество клеток для введения в данной дозе или ее дробной части. Таким образом, каждый флакон, в некоторых аспектах, может содержать однократную единичную дозу для введения или может содержать часть требуемой дозы, при этом больше одного из множества флаконов, например, два флакона или 3 флакона, вместе составляет дозу для введения.

[0387] Таким образом, флаконы, описанные в настоящем документе, обычно содержат клетки для введения, например, одну или более единичных доз клеток. Единичная доза может быть количеством или числом клеток, вводимым субъекту, или двухкратным числом (или больше) клеток, подлежащих введению. Это может быть самая

низкая доза или предельно низкая доза клеток, которую могут вводить субъекту.

[0388] В некоторых вариантах осуществления каждый из контейнеров, например, мешков или флаконов индивидуально включают единичную дозу клеток. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления каждый из контейнеров включает одинаковое или примерно или по существу одинаковое количество клеток. В некоторых вариантах осуществления каждая единичная доза содержит по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере  $1 \times 10^6$ ,  $2 \times 10^6$ ,  $5 \times 10^6$ ,  $1 \times 10^7$ ,  $5 \times 10^7$  или  $1 \times 10^8$  модифицированных клеток, всех клеток, Т-клеток или МКПК. В некоторых вариантах осуществления объем включенной в состав композиции клеток в каждом контейнере, например, мешке или флаконе, составляет от 10 мл до 100 мл, например, по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере или приблизительно 20 мл, 30 мл, 40 мл, 50 мл, 60 мл, 70 мл, 80 мл, 90 мл или 100 мл. В некоторых вариантах осуществления клетки в контейнере, например, мешке или флаконе, могут быть криоконсервированы. В некоторых вариантах осуществления контейнер, например флаконы, может храниться в жидком азоте до последующего применения.

[0389] В некоторых вариантах осуществления такие клетки, полученные способом, или композицию, включающую такие клетки, вводят субъекту для лечения заболевания или состояния.

#### **Г. Примерные признаки процесса и/или готовой композиции**

[0390] В конкретных вариантах осуществления предложенные способы применяются в отношении процесса, который обеспечивает получение или создание одной или более готовых композиций обогащенных Т-клеток из одной или более исходных композиций и/или из одного биологического образца. В некоторых вариантах осуществления одна или более готовых композиций содержат клетки, экспрессирующие рекомбинантный рецептор, например, TCR или CAR. В конкретных вариантах осуществления клетки готовых композиций подходят для введения субъекту в качестве терапии, например, аутологичной клеточной терапии. В некоторых вариантах осуществления одна или более готовых композиций представляют собой композицию обогащенных CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления одна или более готовых композиций включают композицию обогащенных CD4<sup>+</sup> Т-клеток. В конкретных вариантах осуществления одна или более готовых композиций включают композицию обогащенных CD8<sup>+</sup> Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления одна или более готовых композиций включают готовую композицию обогащенных CD4<sup>+</sup> Т-клеток и готовую композицию обогащенных CD8<sup>+</sup> Т-клеток.

[0391] В некоторых вариантах осуществления предложенные способы применяются в отношении всего процесса создания или получения готовых клеток и/или готовых композиций обогащенных Т-клеток, при этом такой процесс включает некоторые или все этапы из следующего: сбор или получение биологического образца; выделение, отбор или обогащение исходных клеток из биологического образца; криоамораживание и хранение исходных клеток; размораживание и/или инкубирование исходных клеток при

стимулирующих условиях; модификация стимулированных клеток с той целью, чтобы они экспрессировали или содержали рекомбинантный полинуклеотид, например, полинуклеотид, кодирующий рекомбинантный рецептор, такой как CAR; культивирование модифицированных клеток до порогового количества, плотности или экспансии; включение культивируемых клеток в готовой композиции в состав; и/или криоаморазивание и хранение состава готовых клеток до извлечения клеток для инфузии и/или введения субъекту. В некоторых вариантах осуществления весь процесс проводят с одной композицией обогащенных Т-клеток, например, CD4+ Т-клеток или CD4+ и CD8+ Т-клеток. В конкретных вариантах осуществления весь процесс проводят с двумя или более композициями обогащенных Т-клеток, например, композицией обогащенных CD4+ Т-клеток и композицией обогащенных CD8+ Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления процесс проводят с двумя или более исходными композициями обогащенных Т-клеток, которые объединяют до и/или во время процесса с созданием или получением одной готовой композиции обогащенных Т-клеток.

[0392] В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одну отдельную композицию обогащенных CD4+ Т-клеток и по меньшей мере одну отдельную композицию обогащенных CD8+ Т-клеток выделяют, отбирают и/или обогащают из одного и того же биологического образца (например, одного и того же продукта афереза или лейкофереза, содержащего аутологичные МКПК), который получен, собран и/или забран у одного и того же субъекта, такого как пациент или здоровый донор. В одном аспекте один и тот же биологический образец сначала подвергают положительному отбору CD4+ Т-клеток, где сохраняют отрицательные и положительные фракции, а затем отрицательную фракцию подвергают положительному отбору CD8+ Т-клеток. В другом аспекте один и тот же биологический образец сначала подвергают положительному отбору CD8+ Т-клеток, где сохраняют отрицательные и положительные фракции, а затем отрицательную фракцию подвергают положительному отбору CD4+ Т-клеток. В некоторых аспектах отдельную композицию обогащенных CD4+ Т-клеток и отдельную композицию обогащенных CD8+ Т-клеток от того же донора отдельно замораживают, например, подвергают криоаморозке или криоконсервации в среде для криоконсервации. В некоторых аспектах отдельные криоконсервированные композиции клетки хранят и/или транспортируют в отдельных контейнерах. В других аспектах криоконсервированные композиции клеток размораживают и, необязательно, промывают. В некоторых аспектах две или более отдельных композиций обогащенных Т-клеток, по меньшей мере одна из которых является композицией обогащенных CD4+ Т-клеток, и по меньшей мере одна является отдельной композицией обогащенных CD8+ Т-клеток от того же донора, отдельно активируют и/или стимулируют посредством контакта со стимулирующим реагентом (например, при инкубировании с CD3/CD28-конъюгированными магнитными сферами для активации Т-клеток), и объемы отдельных обогащенных композиций клеток после активации/стимуляции необязательно регулируют, например, уменьшают, с получением требуемого объема. В некоторых аспектах активированные/стимулированные

обогащенные композиции клеток отдельно модифицируют, трансдуцируют и/или трансфицируют, например, с помощью одного и того же ретровирусного вектора, кодирующего рекомбинантный белок (например, CAR), для экспрессии одного и того же рекомбинантного белка в отдельных композициях CD4+ Т-клеток и CD8+ Т-клеток. В некоторых аспектах объемы отдельных обогащенных композиций клеток после модификации необязательно регулируют, например, уменьшают, с получением требуемого объема. В некоторых аспектах способ может включать удаление стимулирующего реагента, например, магнитных сфер, из отдельных композиций. В некоторых аспектах композицию, содержащую отдельно модифицированные CD4+ Т-клетки, и композицию, содержащую отдельно модифицированные CD8+ Т-клетки, отдельно культивируют, например, для размножения популяции CD4+ или CD8+ Т-клеток в них. В некоторых вариантах осуществления отдельные композиции клеток после культивирования отдельно получают и/или собирают, и/или отдельно включают в состав, например, путем промывки композиций клеток в буфере для состава. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одну включенную в отдельный состав обогащенную композицию CD4+ Т-клеток и по меньшей мере одну включенную в отдельный состав обогащенную композицию CD8+ Т-клеток, замораживают, например, подвергают криозаморозке или криоконсервации в среде для криоконсервации. В некоторых аспектах отдельные криоконсервированные составы могут хранить и/или транспортировать в отдельных контейнерах. В некоторых аспектах по меньшей мере один состав CD4+ Т-клеток и по меньшей мере один состав CD8+ Т-клеток, полученные от одного донора и экспрессирующие один и тот же рекомбинантный белок (например, CAR), отдельно вводят нуждающемуся в этом субъекту. В некоторых аспектах отдельные введения производят одновременно или последовательно, в любом порядке.

[0393] В некоторых вариантах осуществления готовая композиция обогащенных CD4+ Т-клеток включает по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99%, по меньшей мере 99,5%, по меньшей мере 99,9% или 100% или приблизительно 100% CD4+ Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления готовая композиция включает по меньшей мере 30%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99%, по меньшей мере 99,5%, по меньшей мере 99,9% или 100% или приблизительно 100% CD4+ Т-клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор и/или трансдуцированных или трансфицированных рекомбинантным полинуклеотидом. В некоторых вариантах осуществления готовая композиция обогащенных CD4+ Т-клеток включает меньше 40%, меньше 35%, меньше 30%, меньше 25%, меньше 20%, меньше 15%, меньше 10%, меньше 5%, меньше 1%, меньше 0,1% или меньше 0,01% CD8+ Т-клеток, и/или не содержит CD8+ Т-клетки, и/или не содержит или по существу не содержит CD8+ Т-клетки.

[0394] В некоторых вариантах осуществления готовая композиция обогащенных CD8+ Т-клеток включает по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99%, по меньшей мере 99,5%, по меньшей мере 99,9% или 100% или приблизительно 100% CD8+ Т-клеток. В конкретных вариантах осуществления композиция включает по меньшей мере 30%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99%, по меньшей мере 99,5%, по меньшей мере 99,9% или 100% или приблизительно 100% CD8+ Т-клетки, экспрессирующие рекомбинантный рецептор и/или трансдуцированных или трансфицированных рекомбинантным полинуклеотидом. В некоторых вариантах осуществления готовая композиция обогащенных CD8+ Т-клеток включает меньше 40%, меньше 35%, меньше 30%, меньше 25%, меньше 20%, меньше 15%, меньше 10%, меньше 5%, меньше 1%, меньше 0,1% или меньше 0,01% CD4+ Т-клеток, и/или не содержит CD4+ Т-клетки, и/или не содержит или по существу не содержит CD4+ Т-клетки.

[0395] В некоторых вариантах осуществления процесс, связанный с предложенными способами, сравнивают с примерным и/или альтернативным процессом. В конкретных вариантах осуществления альтернативный и/или примерный процесс может отличаться по одному или более определенным аспектам, но в остальном содержит подобные или такие же признаки, аспекты, этапы, стадии, реагенты и/или условия процесса, связанного с предложенными способами. В некоторых вариантах осуществления альтернативный и/или примерный процесс аналогичен или является таким же, как процесс, связанный с предложенными способами, за исключением того, что: композиции обогащенных CD4+ Т-клеток не инкубируют и/или не культивируют с рекомбинантным IL-2; клетки инкубируют со стимулирующим реагентом в отношении больше 3 (или 3:1) стимулирующего реагента к клеткам; стимулирующий реагент не удаляют или не отделяют от клеток до культивирования и/или в течение 6, 5 или 4 дней с начала инкубирования при стимулирующих условиях; клетки не инкубируют в присутствии антиоксиданта; клетки не модифицируют с низким количеством или концентрацией, например от 1 мкг/мл до 50 мкг/мл, поликатиона; клетки не культивируют с поверхностно-активным веществом; и/или клетки не культивируют при условиях с постоянной перфузией и/или перемешиванием.

[0396] В некоторых вариантах осуществления процесс завершают в течение периода и/или промежутка времени, составляющего или составляющего приблизительно 35 дней, 34 дней, 33 дней, 32 дней, 31 дня, 30 дней, 29 дней, 28 дней, 27 дней, 26 дней, 25 дней, 24 дней, 23 дней, 22 дней, 21 дня, 20 дней, 19 дней, 18 дней, 17 дней, 16 дней, 15 дней, 14 дней, 13 дней, 12 дней, 11 дней, 10 дней, 9 дней или меньше 9 дней. В некоторых вариантах осуществления процесс завершают в течение 21 дня. В некоторых вариантах осуществления процесс считают завершенным, когда композиция собрана и/или включена

в состав; композиция готова к сбору и/или включению в состав; композиция достигла целевого порогового значения для сбора; и/или композиция выпущена и/или готова к тестированию после изготовления состава.

[0397] В некоторых вариантах осуществления процесс завершают в течение периода и/или промежутка времени, составляющего или составляющего приблизительно 35 дней, 34 дней, 33 дней, 32 дней, 31 дня, 30 дней, 29 дней, 28 дней, 27 дней, 26 дней, 25 дней, 24 дней, 23 дней, 22 дней, 21 дня, 20 дней, 19 дней, 18 дней, 17 дней, 16 дней, 15 дней, 14 дней, 13 дней, 12 дней, 11 дней, 10 дней, 9 дней или меньше 9 дней, при измерении с начала или забора биологического образца и/или выделения, отбора, стимуляции и/или обогащения исходных клеток из биологического образца до момента выпуска готовых клеток для инфузии; момента, когда готовые клетки собраны и/или включены в состав; готовые клетки готовы к сбору и/или включению в состав; готовые клетки достигли целевого порогового значения для сбора; и/или готовые клетки выпущены и/или готовы к тестированию после изготовления состава, включая время хранения для криозамороженных композиций. В конкретных вариантах осуществления, когда процесс проводят больше чем с одной композицией обогащенных Т-клеток, полученных из одного и того же биологического образца, процесс завершают, когда по меньшей мере один репрезентативный образец каждой композиции из одного и того же биологического образца проходит процесс. В некоторых вариантах осуществления процесс завершают в течение 21 дня при измерении с начала или забора биологического образца и/или выделения, отбора, стимуляции и/или обогащения исходных клеток из биологического образца до момента выпуска готовых клеток для инфузии.

[0398] В некоторых вариантах осуществления процесс завершают в течение периода и/или промежутка времени, составляющего или составляющего приблизительно 35 дней, 34 дней, 33 дней, 32 дней, 31 дня, 30 дней, 29 дней, 28 дней, 27 дней, 26 дней, 25 дней, 24 дней, 23 дней, 22 дней, 21 дня, 20 дней, 19 дней, 18 дней, 17 дней, 16 дней, 15 дней, 14 дней, 13 дней, 12 дней, 11 дней, 10 дней, 9 дней или меньше 9 дней при измерении от начала или забора биологического образца, например, образца афереза или лейкофереза, до момента, когда готовую композицию вводят или готовы для введения субъекту, готовые клетки собраны и/или включены в состав; готовые клетки готовы к сбору и/или включению в состав; готовые клетки достигли целевого порогового значения для сбора; и/или готовая композиция выпущена для тестирования, включая время хранения для криозамороженных композиций. В некоторых вариантах осуществления процесс завершают в течение 21 дня при измерении с начала или забора биологического образца до момента, когда готовые клетки готовы к выпуску и/или выпущены для инфузии субъекту.

[0399] В некоторых вариантах осуществления период и/или промежутков времени для полного выполнения процесса составляет от 10 дней до 35 дней, от 12 дней до 33 дней, от 17 дней до 25 дней или от 19 дней до 23 дней, например, когда время хранения включено, для образцов, полученных у одного субъекта, для образцов от нескольких

субъектов, и/или по меньшей мере для определенного процента субъектов, таких как субъекты, которые имеют конкретное показание или заболевание, например, по меньшей мере 90, 91%, 92%, 93%, 94%, 95 или больше % таких субъектов. В некоторых вариантах осуществления медианный промежуток времени и/или период для полного выполнения процесса (например, при измерении от забора образца у субъекта до момента, когда продукт готов или выпущен для инфузии субъекту) с множеством исходных композиций из различных биологических образцов составляет от 15 дней до 27 дней, от 17 дней до 25 дней или от 19 дней до 23 дней или приблизительно 19 дней, 20 дней, 21 день, 22 дня или 23 дня, например, когда включено время хранения. В конкретных вариантах осуществления средний промежуток времени и/или период для полного выполнения процесса с множеством композиций из различных биологических образцов составляет от 15 дней до 27 дней, от 17 дней до 25 дней, или между 19 дней до 23 дней или составляют приблизительно 19 дней, 20 дней, 21 день, 22 дня или 23 дня, например, когда время транспорта и/или хранения включено. В конкретных вариантах осуществления период для полного выполнения процесса с множеством композиций из различных биологических образцов составляет от 15 дней до 27 дней, от 17 дней до 25 дней или от 19 дней до 23 дней или составляет приблизительно 19 дней, 20 дней, 21 день, 22 дня или 23 дня, например, когда включено время хранения. В некоторых вариантах осуществления продолжительность процесса, например, для набора исходных композиций, таких как из разных биологических образцов и/или от субъектов с разными заболеваниями, составляет меньше или не больше чем 21 день; в некоторых аспектах такой результат достигается больше чем с 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94% или 95% показателем эффективности производства продукта с такими образцами или пациентами.

[0400] В некоторых вариантах осуществления период и/или промежуток времени для полного выполнения процесса составляет от 7 дней до 27 дней, от 9 дней до 25 дней, от 11 дней до 18 дней или от 11 дней до 15 дней, когда не включено или учитывается время хранения криозамороженных клеток. В некоторых вариантах осуществления медианный промежуток времени и/или период, требуемый для завершения процесса с множеством композиций из различных биологических образцов составляет от 7 дней до 27 дней, от 9 дней до 25 дней, от 11 дней до 18 дней или от 11 дней до 15 дней, или составляет или составляет приблизительно 11 дней, 12 дней, 13 дней, 14 дней или 15 дней, когда не включено или не учитывается время хранения криозамороженных клеток. В конкретных вариантах осуществления средний промежуток времени и/или период, требуемый для завершения процесса с множеством композиций из разных биологических образцов составляет от 7 дней и 27 дней, от 9 дней до 25 дней, от 11 дней до 18 дней или от 11 дней до 15 дней, или составляет или составляет приблизительно 11 дней, 12 дней, 13 дней, 14 дней или 15 дней, когда не включено или не учитывается время хранения криозамороженных клеток. В некоторых вариантах осуществления средний промежуток времени и/или период, требуемый для завершения процесса с множеством композиций из разных биологических образцов, составляет меньше 21 дня, когда не включено время



хранения криоамороженных клеток.

[0401] В конкретных вариантах осуществления промежутков времени для полного выполнения процесса по меньшей мере с 10% из множества композиций, полученных из разных источников, например, разных биологических образцов и/или разных исходных композиций обогащенных Т-клеток, выделенных, обогащенных и/или отобранных из разных биологических образцов, составляет от 7 дней до 18 дней, от 10 дней до 17 дней или от 11 дней до 15 дней, или составляет или составляет приблизительно 11 дней, 12 дней или 13 дней, когда не включено или не учитывается время хранения криоамороженных клеток. В конкретных вариантах осуществления промежутков времени, требуемый для полного выполнения процесса по меньшей мере с 50% из множества композиций из разных биологических источников, составляет от 7 дней до 27 дней, от 9 дней до 25 дней, от 11 дней до 18 дней или от 11 дней до 15 дней, или составляют или составляет приблизительно 11 дней, 12 дней, 13 дней, 14 дней или 15 дней, когда не включено или не учитывается время хранения криоамороженных клеток. В некоторых вариантах осуществления промежутков времени, требуемый для полного выполнения процесса по меньшей мере с 90% из множества композиций из разных источников, составляет от 7 дней до 27 дней, от 9 дней до 25 дней, от 11 дней до 18 дней или от 11 дней до 15 дней, или составляет или составляет приблизительно 11 дней, 12 дней, 13 дней, 14 дней или 15 дней, когда не включено или не учитывается время хранения криоамороженных клеток. В некоторых вариантах осуществления промежутков времени, требуемый для полного выполнения процесса по меньшей мере с 90% из множества композиций из разных источников, составляет меньше 21 дня, когда не включено время хранения криоамороженных клеток.

[0402] В некоторых вариантах осуществления период и/или промежутков времени во время процесса, который проходит с начала или инициирования инкубирования при стимулирующих условиях до момента, в который во время культивирования достигается пороговое количество, плотность и/или степень экспансии (например, конкретная кратная экспансия, такая как четырехкратная, или конкретная доза), составляет от 5 дней до 25 дней, от 7 дней до 18 дней, от 8 и 15 дней, от 8 и 14 дней или от 8 до 15 дней, например, от 8 до 13 дней или от 9 дней до 13 дней. В некоторых вариантах осуществления медианный промежуток времени и/или продолжительность процесса, который проходит с начала или инициирования инкубирования до момента, в который достигается пороговое значение, составляет от 5 дней и 25 дней, от 7 дней до 18 дней или от 9 дней до 13 дней, или составляет или составляет приблизительно 8 дней, 9 дней, 10 дней, 11 дней, 12 дней или 13 дней. В конкретных вариантах осуществления средний промежуток времени и/или продолжительность процесса, который проходит с начала или инициирования инкубирования до момента, в который достигается пороговое значение, составляет от 5 дней до 25 дней, от 7 дней до 18 дней, от 8 дней до 13 дней или от 9 дней до 13 дней, или составляет или составляет приблизительно 8 дней, 9 дней, 10 дней, 11 дней, 12 дней или 13 дней.

[0403] В некоторых вариантах осуществления период и/или промежутков времени во время процесса, который проходит с начала или инициирования инкубирования при стимулирующих условиях до момента, в который готовые клетки собирают, включают в состав и/или подвергают криозаморозке, составляет от 5 дней до 25 дней, от 7 дней до 18 дней, от 8 до 15 дней, от 8 до 14 дней или от 8 до 15 дней, например, от 8 до 13 дней или от 9 дней до 13 дней. В некоторых вариантах осуществления медианный промежуток времени и/или продолжительность процесса, который проходит с начала или инициирования инкубирования до момента, в который достигается пороговое значение, составляет от 5 дней до 25 дней, от 7 дней до 18 дней или от 9 дней до 13 дней, или составляет или составляет приблизительно 8 дней, 9 дней, 10 дней, 11 дней, 12 дней или 13 дней. В конкретных вариантах осуществления средний промежуток времени и/или продолжительность процесса, который проходит с начала или инициирования инкубирования до момента, в который достигается пороговое значение, составляет от 5 дней до 25 дней, от 7 дней до 18 дней, от 8 дней до 13 дней или от 9 дней до 13 дней, или составляет или составляет приблизительно 8 дней, 9 дней, 10 дней, 11 дней, 12 дней или 13 дней. В некоторых вариантах осуществления период и/или промежутков времени во время процесса, который проходит с начала или инициирования инкубирования при стимулирующих условиях до момента, в который готовые клетки собирают, включают в состав и/или подвергают криозаморозке, составляет от 9 дней до 15 дней, для, приблизительно для или по меньшей мере для 85%, 90%, 95% субъектов.

[0404] В некоторых вариантах осуществления период и/или промежутков времени во время процесса, который проходит от выделения, обогащения и/или отбора композиций обогащенных CD4+ и CD8+ клеток из биологического образца, например, афереза и/или лейкофереза, до момента, в который готовые клетки собирают, включают в состав и/или подвергают криозаморозке, составляет от 5 дней до 25 дней, от 7 дней до 18 дней, от 8 до 19 дней, от 8 до 14 дней или от 10 до 16 дней. В некоторых вариантах осуществления готовые клетки собирают, включают в состав и получают через 10-16 дней после выделения, обогащения и/или отбора по меньшей мере для 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% субъектов.

[0405] В некоторых вариантах осуществления период и/или промежутков времени процесса с начала или инициирования инкубирования при стимулирующих условиях до момента, в который достигается пороговое количество, плотность и/или экспансия во время культивирования, составляет по меньшей мере на 5%, по меньшей мере на 10%, по меньшей мере на 15%, по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 25%, по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 35%, по меньшей мере на 40%, по меньшей мере на 45%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 55%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 65%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85% или по меньшей мере на 90% меньше времени, чем в случае примерного и/или альтернативного процесса. В конкретных вариантах осуществления продолжительность и/или промежутков времени во время процесса с

начала или инициирования инкубирования при стимулирующих условиях до момента, в который достигаются пороговое количество, плотность и/или экспансия во время культивирования, короче, чем продолжительность и/или промежутков времени примерного и/или альтернативного процесса, на, приблизительно на или по меньшей мере на 0,5 дня, 1 день, 1,5 дня, 2 дня, 3 дня, 4 дня, 5 дней, 6 дней, 7 дней, 8 дней, 9 дней, 10 дней, 11 дней, 12 дней, 13 дней, 14 дней или больше чем на 14 дней.

[0406] В некоторых вариантах осуществления промежутков времени, требуемый, чтобы по меньшей мере 10% из множества композиций из разных биологических образцов достигли порогового количества, плотности и/или размножения с начала или инициирования инкубирования при стимулирующих условиях, до момента, когда пороговое количество, плотность и/или размножение достигается во время культивирования, составляет от 5 дней до 20 дней, от 7 дней до 15 дней или от 9 дней до 11 дней, или составляет или составляет приблизительно 7 дней, 8 дней, 9 дней или 10 дней. В конкретных вариантах осуществления промежутков времени, требуемый, чтобы по меньшей мере 50% из множества композиций из разных биологических образцов достигли порогового количества, плотности и/или экспансии с начала или инициирования инкубирования при стимулирующих условиях, составляет от 5 дней до 25 дней, от 7 дней до 18 дней или от 9 дней до 13 дней, или составляет или составляет приблизительно 7 дней, 8 дней, 9 дней, 10 дней, 11 дней, 12 дней, 13 дней. В некоторых вариантах осуществления промежутков времени, требуемый, чтобы по меньшей мере 90% из множества композиций из разных биологических образцов достигли порогового количества, плотности и/или экспансии с начала или инициирования инкубирования при стимулирующих условиях, составляет от 5 дней до 25 дней, от 7 дней до 18 дней или от 9 дней до 13 дней, или составляет или составляет приблизительно 7 дней, 8 дней, 9 дней, 10 дней, 11 дней, 12 дней, 13 дней.

[0407] В некоторых вариантах осуществления способы, представленные в настоящем документе, применяются в отношении процесса, который позволяет создавать генетически модифицированные Т-клетки в течение промежутка времени, который меньше, чем в случае примерного альтернативного процесса. В некоторых вариантах осуществления короткая продолжительность процесса может увеличить скорость, случаи и/или вероятность создания композиции модифицированных Т-клеток, которые можно вводить субъекту для клеточной терапии. В некоторых вариантах осуществления протоколы производства терапевтических клеточных композиций могут требовать получения и выпуска клеточных композиций для инфузии в течение определенного количества времени. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления можно ожидать, что более короткая продолжительность процесса приведет к уменьшению или устранению сбоев процесса, которые могут возникать из-за того, что композиции клеток не размножаются в течение требуемого периода времени.

[0408] В некоторых вариантах осуществления предложенного в настоящем документе способа промежутков времени, требуемый для того, чтобы композиция клеток

достигла порогового количества, плотности и/или экспансии, с начала или инициирования инкубирования при стимулирующих условиях до момента, когда пороговое количество, плотность и/или экспансия достигаются во время культивирования, составляет от приблизительно 9 дней до приблизительно 13 дней или от 9 дней до 13 дней, или 9 дней, тогда как в альтернативном процессе соответствующий промежуток времени составляет от приблизительно 12 дней до приблизительно 23 дней или от 12 дней до 23 дней, или приблизительно 15 дней или 15 дней. В некоторых вариантах осуществления промежуток времени, требуемый для сбора образцов, выделения композиций клеток и криозаморозки как в предложенном процессе, так и в альтернативном процессе, составляет от приблизительно 1 дня до приблизительно 2 дней или от 1 дня до 2 дней. В некоторых вариантах осуществления криозамороженные композиции клеток как в предложенном процессе, так и в альтернативном процессе хранят в течение приблизительно 3 дней или в течение 3 дней. В некоторых вариантах осуществления промежуток времени, требуемый с момента, когда достигается пороговое количество, плотность и/или экспансия, или когда собирают композиции клеток, до момента, когда готовую композицию вводят или готовы для введения субъекту, как в предложенном процессе, так и в альтернативном процессе, составляет 5 дней или приблизительно 5 дней. В некоторых вариантах осуществления общая продолжительность промежутка времени, требуемого с момента забора образца до момента, когда готовую композицию вводят или готовы для введения субъекту, в предложенном процессе составляет 19 дней или приблизительно 19 дней, тогда как в альтернативном процессе соответствующая общая продолжительность промежутка времени составляет 25 дней или приблизительно 25 дней.

[0409] В некоторых вариантах осуществления общая продолжительность промежутка времени, требуемого для 50% или приблизительно 50% из множества композиций клеток с момента забора образца до момента, когда готовые композиции вводят или готовы для введения субъекту (что может требовать, чтобы композиции клеток достигли порогового количества, плотности и/или экспансии), в предложенном процессе составляет 19 дней или приблизительно 19 дней, тогда как в альтернативном процессе соответствующая общая продолжительность промежутка времени составляет 25 дней или приблизительно 25 дней. В некоторых вариантах осуществления общая продолжительность промежутка времени, требуемого для 80% или приблизительно 80% из множества композиций клеток с момента забора образца до момента, когда готовые композиции вводят или готовы для введения субъекту (что может требовать, чтобы композиции клеток достигли порогового количества, плотности и/или экспансии), в предложенном процессе составляет 21 день или приблизительно 21 день, тогда как в альтернативном процессе соответствующая общая продолжительность промежутка времени составляет 27 дней или приблизительно 27 дней. В некоторых вариантах осуществления общая продолжительность промежутка времени, требуемого для 90% или приблизительно 90% из множества композиций клеток с момента забора образца до момента, когда готовые композиции вводят или готовы для введения субъекту (что может

требовать, чтобы композиции клеток достигли порогового количества, плотности и/или экспансии), в предложенном процессе составляет 21 день или приблизительно 21 день, тогда как в альтернативном процессе соответствующая общая продолжительность промежутка времени составляет 33 дня или приблизительно 33 дня.

[0410] с начала или инициирования инкубирования при стимулирующих условиях до момента, когда пороговое количество, плотность и/или экспансия достигаются во время культивирования, составляет

[0411] В некоторых вариантах осуществления предложенные способы применяются в отношении эффективного создания или получения готовых композиций модифицированных Т-клеток, подходящих для применения в клеточной терапии. В некоторых вариантах осуществления готовая композиция успешно создана, если клетки композиции достигают порогового количества клеток, плотности и/или экспансии во время культивирования. В конкретных вариантах осуществления готовая композиция успешно создана, если клетки в количестве по меньшей мере 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90% или 95% клеток экспрессируют рекомбинантный рецептор. В конкретных вариантах осуществления готовая композиция успешно получена или создана, если готовая композиция подходит для терапевтического применения, например, в качестве аутологичной клеточной терапии. В конкретных вариантах осуществления готовая композиция подходит для терапевтического применения, если клетки готовых композиций соответствуют одному или более критериям. В некоторых вариантах осуществления клетки и/или композиции клеток, подходящие для применения в клеточной терапии, являются стерильными (например, не имеют поддающейся обнаружению микробиологической контаминации), не содержат эндотоксин, не содержат репликационно-компетентного вируса, являются жизнеспособными, активными (например, обладают цитолитической активностью и/или выбрасывают цитокин в ответ на антиген-мишень) и/или содержат высокий процент клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор.

[0412] В конкретных вариантах осуществления предложенные способы обладают по меньшей мере 80%, по меньшей мере 81%, по меньшей мере 82%, по меньшей мере 83%, по меньшей мере 84%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% возможностью или вероятностью успешного создания или получения готовой композиции обогащенных Т-клеток из композиции исходных клеток и/или биологического образца. В некоторых вариантах осуществления возможность или вероятность составляет от 85% до 100%, от 90% до 95% или от 92% до 94%. В некоторых вариантах осуществления предложенные способы позволяют успешно создавать или получать готовую композицию обогащенных Т-клеток из по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 81%, по меньшей мере 82%,

по меньшей мере 83%, по меньшей мере 84%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% композиций и/или образцов из множества композиций исходных клеток и/или множества биологических образцов. В некоторых вариантах осуществления предложенные способы позволяют успешно создавать или получать готовую композицию обогащенных Т-клеток из 85-100%, 90-95% или 92-94% композиций и/или образцов из множества композиций исходных клеток и/или из множества биологических образцов.

[0413] В некоторых вариантах осуществления процесс завершается в течение 21 дня и имеет показатель эффективности по меньшей мере 85%, 90%, 95% или больше. В некоторых вариантах осуществления процесс считается полностью выполненным, когда готовые клетки вводят и/или готовы для введения субъекту. В некоторых вариантах осуществления процесс считается полностью выполненным, когда готовая композиция была собрана и/или готова к тестированию и/или оценке, например, такой как анализ при выпуске.

[0414] В конкретных вариантах осуществления процесс, связанный с предложенными способами, имеет возможность или вероятность успешного создания или получения готовой композиции, которая больше, чем возможность или вероятность успешного создания или получения готовой композиции в альтернативном и/или примерном процессе, по меньшей мере на 0,5%, по меньшей мере на 1%, по меньшей мере на 1,5%, по меньшей мере на 2%, по меньшей мере на 2,5%, по меньшей мере на 3%, по меньшей мере на 3,5%, по меньшей мере на 4,0%, по меньшей мере на 4,5%, по меньшей мере на 5%, по меньшей мере на 5,5%, по меньшей мере на 6%, по меньшей мере на 6,5%, по меньшей мере на 7%, по меньшей мере на 7,5%, по меньшей мере на 8%, по меньшей мере на 8,5%, по меньшей мере на 9%, по меньшей мере на 9,5% или по меньшей мере на 10% или больше чем на 10%.

[0415] В некоторых вариантах осуществления процесс, связанный с предложенными способами, имеет возможность или вероятность успешного создания или получения готовой композиции обогащенных CD4+ Т-клеток, которая больше, чем возможность или вероятность успешного создания или получения готовой композиции обогащенных CD4+ Т-клеток в альтернативном и/или примерном процессе, по меньшей мере на 0,5%, по меньшей мере на 1%, по меньшей мере на 1,5%, по меньшей мере на 2%, по меньшей мере на 2,5%, по меньшей мере на 3%, по меньшей мере на 3,5%, по меньшей мере на 4,0%, по меньшей мере на 4,5%, по меньшей мере на 5%, по меньшей мере на 5,5%, по меньшей мере на 6%, по меньшей мере на 6,5%, по меньшей мере на 7%, по меньшей мере на 7,5%, по меньшей мере на 8%, по меньшей мере на 8,5%, по меньшей мере на 9%, по меньшей мере на 9,5% или по меньшей мере на 10% или больше чем на 10%.

[0416] В конкретных вариантах осуществления процесс, связанный с предложенными способами, имеет возможность или вероятность успешного создания или получения готовой композиции обогащенных CD8+ Т-клеток, которая больше, чем возможность или вероятность успешного создания или получения готовой композиции обогащенных CD8+ Т-клеток в альтернативном и/или примерном процессе, по меньшей мере на 0,5%, по меньшей мере на 1%, по меньшей мере на 1,5%, по меньшей мере на 2%, по меньшей мере на 2,5%, по меньшей мере на 3%, по меньшей мере на 3,5%, по меньшей мере на 4,0%, по меньшей мере на 4,5%, по меньшей мере на 5%, по меньшей мере на 5,5%, по меньшей мере на 6%, по меньшей мере на 6,5%, по меньшей мере на 7%, по меньшей мере на 7,5%, по меньшей мере на 8%, по меньшей мере на 8,5%, по меньшей мере на 9%, по меньшей мере на 9,5% или по меньшей мере на 10% или больше чем на 10%.

[0417] В некоторых вариантах осуществления одна или более готовых композиций, созданных или полученных в соответствии с предложенными способами, содержат клетки, экспрессирующие рекомбинантный рецептор, например, TCR или CAR. В некоторых вариантах осуществления экспрессия рекомбинантного рецептора может включать, без ограничения перечисленными, присутствие одного или более белков рекомбинантных рецепторов, локализованных в клеточной мембране и/или на поверхности клеток, присутствие поддающегося обнаружению количества белка рекомбинантного рецептора, присутствие поддающегося обнаружению количества мРНК, кодирующей рекомбинантный рецептор, присутствие или содержание рекомбинантного полинуклеотида, кодирующего рекомбинантный рецептор, и/или присутствие или содержание мРНК или белка, который является суррогатным маркером для экспрессии рекомбинантного рецептора.

[0418] В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 30%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 45%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 55%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 99% или больше чем 99% клеток одной или более готовых композиций экспрессируют рекомбинантный рецептор. В конкретных вариантах осуществления по меньшей мере 40%, по меньшей мере 45%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 55%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 99% или больше 99% CD4+ Т-клеток готовой композиции экспрессируют рекомбинантный рецептор. В некоторых вариантах осуществления от 30% до 90%, от 40% до 85%, от 50% до 80% или от 60% до 80% CD4+ Т-клеток экспрессируют рекомбинантный рецептор. В конкретных вариантах осуществления по меньшей мере 30%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 45%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 55%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере

80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97% или по меньшей мере 99% клеток готовой композиции обогащенных CD4+ Т-клеток экспрессируют рекомбинантный рецептор. В некоторых вариантах осуществления от 30% до 90%, от 40% до 85%, от 50% до 80% или от 60% до 80% клеток готовой композиции обогащенных CD4+ Т-клеток экспрессируют рекомбинантный рецептор.

[0419] В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 30%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 45%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 55%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 99% или больше 99% CD8+ Т-клеток готовой композиции экспрессируют рекомбинантный рецептор. В некоторых вариантах осуществления от 30% до 90%, от 40% до 85%, от 50% до 80% или от 60% до 80% CD8+ Т-клеток экспрессируют рекомбинантный рецептор. В конкретных вариантах осуществления по меньшей мере 30%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 45%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 55%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97% или по меньшей мере 99% клеток готовой композиции обогащенных CD8+ Т-клеток экспрессируют рекомбинантный рецептор. В некоторых вариантах осуществления от 30% до 90%, от 40% до 85%, от 50% до 80% или от 60% до 80% клеток готовой композиции обогащенных CD8+ Т-клеток экспрессируют рекомбинантный рецептор.

[0420] В некоторых вариантах осуществления процент клеток готовой композиции, экспрессирующих рекомбинантный рецептор, превышает процент клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор, которые были получены или созданы в альтернативном и/или примерном процессе, например, по меньшей мере на 0,5%, по меньшей мере на 1%, по меньшей мере на 1,5%, по меньшей мере на 2%, по меньшей мере на 2,5%, по меньшей мере на 3%, по меньшей мере на 3,5%, по меньшей мере на 4,0%, по меньшей мере на 4,5%, по меньшей мере на 5%, по меньшей мере на 5,5%, по меньшей мере на 6%, по меньшей мере на 6,5%, по меньшей мере на 7%, по меньшей мере на 7,5%, по меньшей мере на 8%, по меньшей мере на 8,5%, по меньшей мере на 9%, по меньшей мере на 9,5% или по меньшей мере на 10% или больше чем на 10%.

[0421] В некоторых вариантах осуществления процент CD4+ Т-клеток готовой композиции, экспрессирующих рекомбинантный рецептор, превышает процент CD4+ Т-клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор, которые были получены или созданы в альтернативном и/или примерном процессе, например, по меньшей мере на 0,5%, по меньшей мере на 1%, по меньшей мере на 1,5%, по меньшей мере на 2%, по меньшей мере на 2,5%, по меньшей мере на 3%, по меньшей мере на 3,5%, по меньшей мере на 4,0%, по меньшей мере на 4,5%, по меньшей мере на 5%, по меньшей мере на 5,5%, по меньшей мере на 6%, по меньшей мере на 6,5%, по меньшей мере на 7%, по меньшей мере на 7,5%, по меньшей мере на 8%, по меньшей мере на 8,5%, по меньшей мере



мере на 9%, по меньшей мере на 9,5% или по меньшей мере на 10% или больше чем на 10%.

[0422] В некоторых вариантах осуществления процент CD8+ Т-клеток готовой композиции, экспрессирующих рекомбинантный рецептор, превышает процент CD8+ Т-клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор, которые были получены или созданы в альтернативном и/или примерном процессе, например, по меньшей мере на 0,5%, по меньшей мере на 1%, по меньшей мере на 1,5%, по меньшей мере на 2%, по меньшей мере на 2,5%, по меньшей мере на 3%, по меньшей мере на 3,5%, по меньшей мере на 4,0%, по меньшей мере на 4,5%, по меньшей мере на 5%, по меньшей мере на 5,5%, по меньшей мере на 6%, по меньшей мере на 6,5%, по меньшей мере на 7%, по меньшей мере на 7,5%, по меньшей мере на 8%, по меньшей мере на 8,5%, по меньшей мере на 9%, по меньшей мере на 9,5% или по меньшей мере на 10% или больше чем на 10%.

[0423] В некоторых вариантах осуществления одна или более готовых композиций, созданных или полученных предложенными способами, содержат активированные клетки и/или содержат клетки, которые имеют или экспонируют один или более маркеров активации. В конкретных вариантах осуществления клетки готовых композиций, полученных или созданных предложенными способами, являются более активированными и/или имеют или экспонируют большее количество или степень одного или более маркеров активации, чем клетки, созданные или полученные примерным и/или альтернативным процессом. Маркеры активации могут включать любой известный маркер, который указывает, коррелирует и/или ассоциирован с состоянием активации в иммунной клетке, такой как Т-клетка. В некоторых вариантах осуществления маркеры активации включают, без ограничения перечисленными, увеличение сложности внутриклеточной структуры (например, при определении путем измерения бокового светорассеяния (SSC)), увеличение размера клетки (например, при определении путем измерения диаметра клетки и/или прямого светорассеяния (FSC)), повышенную экспрессию CD27 и/или сниженную экспрессию CD25.

[0424] В некоторых вариантах осуществления готовые клетки, созданные или полученные предложенными способами, крупнее, чем клетки, созданные или полученные альтернативным и/или примерным процессом. В некоторых вариантах осуществления параметры FSC и/или SSC измеряют и сравнивают с референсным и/или стандартным значением для оценки размера клеток, например, с помощью проточной цитометрии. В некоторых вариантах осуществления параметр FSC измеряют и сравнивают с референсным или стандартным значением для оценки размера клеток. В некоторых вариантах осуществления диаметр клеток, например, медианный или средний диаметр клеток готовой композиции по меньшей мере на 0,25 мкм, 0,5 мкм, 0,75 мкм, 1,0 мкм, 1,5 мкм, 2 мкм, 2,5 мкм, 3 мкм, 3,5 мкм, 4 мкм, 4,5 мкм, 5 мкм или больше чем на 5 мкм больше, чем диаметр клеток, созданных или полученных альтернативным и/или примерным процессом.

[0425] В некоторых вариантах осуществления готовые клетки активны и размножаются и/или способны к активации и размножению, *in vivo*, при введении субъекту. В конкретных вариантах осуществления готовые клетки демонстрируют признаки и/или свойства, которые указывают и/или связаны с эффективностью, активностью и/или размножением *in vivo*. Например, в некоторых вариантах осуществления такие признаки или свойства могут включать экспрессию белка, такого как поверхностный белок, связанный с активацией, пролиферацией и/или размножением. В некоторых вариантах осуществления такие признаки или свойства могут включать продукцию или секрецию факторов, таких как цитокины, например, в ответ на контакт с антигеном.

[0426] В некоторых вариантах осуществления готовые клетки, созданные или полученные предложенными способами, имеют более высокую экспрессию CD25, чем клетки, созданные или полученные альтернативным и/или примерным процессом. В некоторых вариантах осуществления готовые CD4+ Т-клетки имеют более высокую экспрессию CD25, чем CD4+ Т-клетки, созданные или полученные альтернативным и/или примерным процессом. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 20%, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 100% клеток готовой композиции являются положительными при окрашивании на CD25, например, экспрессируют поддающееся обнаружению количество CD25. В конкретных вариантах осуществления готовая композиция содержит больший процент клеток, которые являются положительными на CD25, чем композиция клеток, полученных или созданных альтернативным и/или примерным процессом. В некоторых вариантах осуществления клетки готовой композиции экспрессируют по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 40%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 100%, по меньшей мере на 150%, по меньшей мере в 1 раз, по меньшей мере в 2 раза, по меньшей мере в 3 раза, по меньшей мере в 4 раза или по меньшей мере в 5 раз больше CD25, например, как показано при измерении средней или медианной экспрессии CD25 в клетках готовой композиции с помощью проточной цитометрии, по сравнению с клетками, полученными или созданными альтернативным и/или примерным процессом.

[0427] В некоторых вариантах осуществления экспрессия CD27 готовыми клетками, созданными или полученными предложенными способами, снижена по сравнению с экспрессией CD27 в клетках, созданных или полученных альтернативным и/или примерным процессом. В некоторых вариантах осуществления большая часть клеток готовой композиции является отрицательной на CD27 и/или имеет низкие или необнаружимые уровни CD27, чем часть клеток, созданных или полученных альтернативным и/или примерным процессом. В некоторых вариантах осуществления

экспрессия CD27, например, средняя или медианная экспрессия CD27, при измерении с помощью проточной цитометрии, клетками готовой композиции снижена по меньшей мере на 1%, по меньшей мере на 5%, по меньшей мере на 10%, по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 40%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95% или по меньшей мере на 99% по сравнению с клетками, созданными или полученными в альтернативном и/или примерном процессе.

[0428] В некоторых вариантах осуществления готовые клетки, созданные или полученные предложенными способами, имеют более высокую экспрессию маркеров, связанных с делением клеток, чем клетки, созданные или полученные альтернативным и/или примерным процессом. В некоторых вариантах осуществления готовые клетки экспрессируют Ki67. В некоторых вариантах осуществления большая часть готовых CD4+ Т-клеток экспрессирует Ki67, чем часть CD4+ Т-клеток, созданных или полученных альтернативным и/или примерным процессом. В некоторых вариантах осуществления большая часть готовых CD8+ Т-клеток экспрессирует Ki67, чем часть CD8+ Т-клеток, созданных или полученных альтернативным и/или примерным процессом. В конкретных вариантах осуществления готовая композиция содержит большую часть клеток, которые являются положительными на Ki67, чем композиция клеток, полученных или созданных альтернативным и/или примерным процессом. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 20%, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 100% клеток готовой композиции являются положительными при окрашивании на Ki67, например, экспрессируют поддающееся обнаружению количество Ki67. В некоторых вариантах осуществления клетки готовой композиции экспрессируют по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 40%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 100%, по меньшей мере на 150%, по меньшей мере в 1 раз, по меньшей мере в 2 раза, по меньшей мере в 3 раза, по меньшей мере в 4 раза, по меньшей мере в 5 раз больше Ki67, например, как показано путем измерения средней или медианной экспрессии Ki67 в клетках готовой композиции с помощью проточной цитометрии, по сравнению с клетками, полученными или созданными альтернативным и/или примерным процессом.

[0429] В некоторых вариантах осуществления готовые клетки имеют увеличенную продукцию и/или секрецию, и/или способны к увеличенной продукции и/или секреции одного или более цитокинов, например, в ответ на контакт с антигеном. В некоторых вариантах осуществления готовые клетки имеют увеличенную продукцию и/или секрецию, и/или способны к увеличенной продукции и/или секреции IFN-гамма по сравнению с клетками, полученными или созданными альтернативным и/или примерным

процессом. В некоторых вариантах осуществления CD8+ Т-клетки готовой композиции, например, CD8+ Т-клетки, экспрессирующие рекомбинантный рецептор, имеют увеличенную продукцию и/или секрецию, и/или способны к увеличенной продукции и/или секреции IFN-гамма по сравнению с клетками, полученными или созданными альтернативным и/или примерным процессом. В некоторых вариантах осуществления продукция или секреция готовыми клетками по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 40%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 100%, по меньшей мере на 150%, по меньшей мере в 1 раз, по меньшей мере в 2 раза, по меньшей мере в 3 раза, по меньшей мере в 4 раза или по меньшей мере в 5 раз больше, чем продукция или секреция клетками, полученными альтернативным и/или примерным процессом.

[0430] В некоторых вариантах осуществления готовые клетки имеют увеличенную продукцию и/или секрецию, и/или способны к увеличенной продукции и/или секреции ФНО-альфа по сравнению с клетками, полученными или созданными альтернативным и/или примерным процессом. В некоторых вариантах осуществления CD8+ Т-клетки готовой композиции, например, CD8+ Т-клетки, экспрессирующие рекомбинантный рецептор, имеют увеличенную продукцию и/или секрецию, и/или способны к увеличенной продукции и/или секреции ФНО-альфа по сравнению с клетками, полученными или созданными альтернативным и/или примерным процессом. В некоторых вариантах осуществления продукция или секреция готовыми клетками по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 40%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 100%, по меньшей мере на 150%, по меньшей мере в 1 раз, по меньшей мере в 2 раза, по меньшей мере в 3 раза, по меньшей мере в 4 раза или по меньшей мере в 5 раз больше, чем продукция или секреция клетками, полученными альтернативным и/или примерным процессом.

[0431] В некоторых вариантах осуществления готовые клетки имеют уменьшенную продукцию и/или секрецию одного или более цитокинов, например, в ответ на контакт с антигеном, по сравнению с клетками, полученными или созданными альтернативным и/или примерным процессом. В конкретных вариантах осуществления готовые клетки имеют уменьшенную продукцию и/или секрецию INF-гамма. В некоторых вариантах осуществления CD4+ Т-клетки готовой композиции, например, CD4+ Т-клетки, экспрессирующие рекомбинантный рецептор, имеют уменьшенную продукцию и/или секрецию INF-гамма по сравнению с CD4+ Т-клетками, полученными или созданными альтернативным и/или примерным процессом. В некоторых вариантах осуществления продукция или секреция INF-гамма готовыми клетками, например, CD4+ Т-клетками, экспрессирующими рекомбинантный рецептор, снижена по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 40%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере

мере на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90% или по меньшей мере на 99% по сравнению с продукцией или секрецией клетками, полученными альтернативным и/или примерным процессом.

[0432] В конкретных вариантах осуществления готовые клетки имеют уменьшенную продукцию и/или секрецию IL-2. В некоторых вариантах осуществления CD4+ Т-клетки готовой композиции, например, CD4+ Т-клетки, экспрессирующие рекомбинантный рецептор, имеют уменьшенную продукцию и/или секрецию IL-2 по сравнению с CD4+ Т-клетками, полученными или созданными альтернативным и/или примерным процессом. В некоторых вариантах осуществления продукция или секреция IL-2 готовыми клетками, например, CD4+ Т-клетками, экспрессирующими рекомбинантный рецептор, снижена по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 40%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90% или по меньшей мере на 99% по сравнению с продукцией или секрецией клетками, полученными альтернативным и/или примерным процессом.

[0433] В некоторых вариантах осуществления готовые клетки имеют уменьшенную продукцию и/или секрецию ГМ-КСФ. В конкретных вариантах осуществления CD4+ Т-клетки готовой композиции, например, CD4+ Т-клетки, экспрессирующие рекомбинантный рецептор, имеют уменьшенную продукцию и/или секрецию ГМ-КСФ по сравнению с CD4+ Т-клетками, полученными или созданными альтернативным и/или примерным процессом. В некоторых вариантах осуществления продукция или секреция ГМ-КСФ готовыми клетками, например, CD4+ Т-клетками, экспрессирующими рекомбинантный рецептор, снижена по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 40%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90% или по меньшей мере на 99% по сравнению с продукцией или секрецией клетками, полученными альтернативным и/или примерным процессом.

[0434] В конкретных вариантах осуществления готовые клетки имеют уменьшенную продукцию и/или секрецию MIP1-альфа. В некоторых вариантах осуществления CD4+ Т-клетки готовой композиции, например, CD4+ Т-клетки, экспрессирующие рекомбинантный рецептор, имеют уменьшенную продукцию и/или секрецию MIP1-альфа по сравнению с CD4+ Т-клетками, полученными или созданными альтернативным и/или примерным процессом. В некоторых вариантах осуществления продукция или секреция MIP1-альфа готовыми клетками, например, CD4+ Т-клетками, экспрессирующими рекомбинантный рецептор, снижена по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 40%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90% или по меньшей мере на 99% по сравнению с продукцией или секрецией клетками, полученными альтернативным и/или

примерным процессом.

[0435] В конкретных вариантах осуществления готовые клетки, созданные или полученные предложенными способами, имеют меньшую экспрессию маркеров, ассоциированных с апоптозом, например, уровни активированных каспаз и/или положительного окрашивания с Аннексином V, чем клетки, созданные или полученные альтернативным и/или примерным процессом.

[0436] В некоторых вариантах осуществления готовые CD4+ Т-клетки содержат меньше Аннексин V+ клеток, чем CD4+ Т-клетки, созданные или полученные альтернативным и/или примерным процессом. В некоторых вариантах осуществления меньше чем 25%, меньше чем 20%, меньше чем 18%, меньше чем 16%, меньше чем 15%, меньше чем 14%, меньше чем 13%, меньше чем 12%, меньше чем 11%, меньше чем 10%, меньше чем 8%, меньше чем 6%, меньше чем 5%, меньше чем 3%, меньше чем 1% или меньше чем 0,1% CD4+ клеток готовой композиции являются положительными при окрашивании с Аннексином V, например, связывают и/или способны к связыванию Аннексина V, такого как рекомбинантный и/или меченый Аннексин V. В некоторых вариантах осуществления меньше чем 25%, меньше чем 20%, меньше чем 18%, меньше чем 16%, меньше чем 15%, меньше чем 14%, меньше чем 13%, меньше чем 12%, меньше чем 11%, меньше чем 10%, меньше чем 8%, меньше чем 6%, меньше чем 5%, меньше чем 3%, меньше чем 1% или меньше чем 0,1% CD4+ клеток готовой композиции, экспрессирующие рекомбинантный рецептор, являются положительными при окрашивании с Аннексином V.

[0437] В некоторых вариантах осуществления готовые CD8+ Т-клетки содержат меньше Аннексин V+ клеток, чем CD4+ Т-клетки, созданные или полученные альтернативным и/или примерным процессом. В конкретных вариантах осуществления меньше чем 25%, меньше чем 20%, меньше чем 18%, меньше чем 16%, меньше чем 15%, меньше чем 14%, меньше чем 13%, меньше чем 12%, меньше чем 11%, меньше чем 10%, меньше чем 8%, меньше чем 6%, меньше чем 5%, меньше чем 3%, меньше чем 1% или меньше чем 0,1% CD8+ клеток готовой композиции являются положительными на окрашивание с Аннексином V. В некоторых вариантах осуществления меньше чем 25%, меньше чем 20%, меньше чем 18%, меньше чем 16%, меньше чем 15%, меньше чем 14%, меньше чем 13%, меньше чем 12%, меньше чем 11%, меньше чем 10%, меньше чем 8%, меньше чем 6%, меньше чем 5%, меньше чем 3%, меньше чем 1% или меньше чем 0,1% CD8+ клеток готовой композиции, экспрессирующих рекомбинантный рецептор, являются положительными при окрашивании с Аннексином V.

[0438] В некоторых вариантах осуществления готовые CD4+ Т-клетки содержат меньше клеток, которые являются положительными на активированную каспазу, например, активированную каспазу 3, чем CD4+ Т-клетки, созданные или полученные альтернативным и/или примерным процессом. В конкретных вариантах осуществления меньше чем 25%, меньше чем 20%, меньше чем 18%, меньше чем 16%, меньше чем 15%, меньше чем 14%, меньше чем 13%, меньше чем 12%, меньше чем 11%, меньше чем 10%,

меньше чем 8%, меньше чем 6%, меньше чем 5%, меньше чем 3%, меньше чем 1% или меньше чем 0,1% CD4+ клеток готовой композиции являются положительными на активированную каспазу, например, активированную каспазу 3. В некоторых вариантах осуществления меньше чем 25%, меньше чем 20%, меньше чем 18%, меньше чем 16%, меньше чем 15%, меньше чем 14%, меньше чем 13%, меньше чем 12%, меньше чем 11%, меньше чем 10%, меньше чем 8%, меньше чем 6%, меньше чем 5%, меньше чем 3%, меньше чем 1% или меньше чем 0,1% CD4+ клеток готовой композиции, экспрессирующих рекомбинантный рецептор, являются положительными на активированную каспазу, например, активированную каспазу 3.

[0439] В некоторых вариантах осуществления готовые CD8+ Т-клетки содержат меньше клеток, которые являются положительными на активированную каспазу, например, активированную каспазу 3, чем CD4+ Т-клетки, созданные или полученные альтернативным и/или примерным процессом. В некоторых вариантах осуществления меньше чем 25%, меньше чем 20%, меньше чем 18%, меньше чем 16%, меньше чем 15%, меньше чем 14%, меньше чем 13%, меньше чем 12%, меньше чем 11%, меньше чем 10%, меньше чем 8%, меньше чем 6%, меньше чем 5%, меньше чем 3%, меньше чем 1% или меньше чем 0,1% CD8+ клеток готовой композиции являются положительными на активированную каспазу, например, активированную каспазу 3. В некоторых вариантах осуществления меньше чем 25%, меньше чем 20%, меньше чем 18%, меньше чем 16%, меньше чем 15%, меньше чем 14%, меньше чем 13%, меньше чем 12%, меньше чем 11%, меньше чем 10%, меньше чем 8%, меньше чем 6%, меньше чем 5%, меньше чем 3%, меньше чем 1% или меньше чем 0,1% CD8+ клеток готовой композиции, экспрессирующих рекомбинантный рецептор, являются положительными на активированную каспазу, например, активированную каспазу 3.

[0440] В некоторых вариантах осуществления клетки готовой композиции вводят субъекту. В некоторых вариантах осуществления клетки готовой композиции вводят для лечения заболевания или состояния. В некоторых вариантах осуществления заболевание или состояние представляет собой рак. В некоторых вариантах осуществления клетки готовых композиций вводят субъекту, при этом субъект испытывает уменьшение объема опухоли и/или раковых клеток. В некоторых вариантах осуществления субъект имеет, имеет приблизительно или имеет по меньшей мере 25%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99%, 100% уменьшение количества раковых клеток и/или уменьшение опухоли после введения клеток готовой композиции, например, при сравнении с количеством раковых клеток и/или объема опухоли у субъекта до введения. В некоторых вариантах осуществления введение клеток готовой композиции приводит к увеличению снижения объема опухоли и/или количества раковых клеток у субъекта по сравнению со снижением объема опухоли и/или количества раковых клеток у субъекта после введения готовых клеток, полученных примерным альтернативным процессом.

[0441] В конкретных вариантах осуществления введение клеток готовой композиции приводит к увеличению снижения объема опухоли и/или количества раковых

клеток у субъекта на, приблизительно на или по меньшей мере на 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 125%, 150%, в 1 раз, в 2 раза, в 3 раза, в 4 раза, в 5 раз по сравнению со снижением объема опухоли и/или количества раковых клеток у субъекта после введения готовых клеток, полученных примерным альтернативным процессом.

[0442] В конкретных вариантах осуществления клетки готовой композиции, например, часть и/или дозу клеток готовой композиции, вводят субъекту. В некоторых вариантах осуществления субъект, которому вводят клетки готовой композиции, имеет возможность и/или вероятность достижения и/или испытания полного ответа (CR). В некоторых вариантах осуществления возможность и/или вероятность достижения и/или испытания CR составляет по меньшей мере 10%, по меньшей мере 15%, по меньшей мере 20%, по меньшей мере 25%, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 35%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 45%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 55%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95%. В некоторых вариантах осуществления возможность и/или вероятность достижения и/или испытания CR составляет по меньшей мере 25%. В конкретных вариантах осуществления возможность и/или вероятность достижения CR составляет по меньшей мере 50%.

[0443] В некоторых вариантах осуществления субъект, которому вводят клетки готовой композиции, имеет возможность и/или вероятность достижения и/или испытания ORR. В некоторых вариантах осуществления возможность и/или вероятность достижения и/или испытания ORR составляет по меньшей мере по меньшей мере 40%, по меньшей мере 45%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 55%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95%. В некоторых вариантах осуществления возможность и/или вероятность достижения и/или испытания ORR составляет по меньшей мере 80%. В конкретных вариантах осуществления возможность и/или вероятность достижения ORR составляет по меньшей мере 90%. В некоторых вариантах осуществления возможность и/или вероятность достижения ORR составляет 100% или приблизительно 100%.

[0444] В некоторых вариантах осуществления эффективность готовых клеток, например, вероятность того, что субъект достигнет и/или испытает CR или ORR после введения клеток готовой композиции, больше, чем в случае терапевтической композиции клеток, содержащей клетки, экспрессирующие рекомбинантный рецептор, которые получены альтернативным процессом. В некоторых вариантах осуществления существует по меньшей мере на 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 125%, 150%, в 1 раз, в 2 раза, в 5 раз, 10 раз, в 50 раз или в 100 раз большая вероятность достижения CR или ORR после введения готовых клеток по сравнению с введением клеток терапевтической композиции клеток, полученных альтернативным процессом.

[0445] В некоторых вариантах осуществления готовые клетки, полученные способами, предложенными в настоящем документе, имеют высокую и/или относительно



высокую степень безопасности. В некоторых вариантах осуществления клетки готовой композиции, например, часть и/или дозу клеток готовой композиции, вводят субъекту. В некоторых вариантах осуществления субъект, которому вводят клетки готовой композиции, имеет риск, возможность и/или вероятность испытать токсическое действие, например, CRS или нейротоксичность, которая составляет меньше 80%, 75%, 70%, 60%, 50%, 40%, 30%, 25%, 20%, 15%, 10% или 5%. В некоторых вариантах осуществления токсическое действие является любой степенью нейротоксичности или CRS. В некоторых вариантах осуществления субъект, которому вводят клетки готовой композиции, имеет риск, возможность и/или вероятность меньше 80% развития любой степени CRS или нейротоксичности. В конкретных вариантах осуществления субъект, которому вводят клетки готовой композиции, имеет риск, возможность и/или вероятность меньше 80% развития любой степени CRS или нейротоксичности.

[0446] В некоторых вариантах осуществления клетки готовой композиции, например, часть и/или доза клеток готовой композиции, являются более безопасными, чем клетки готовой композиции, полученной альтернативным процессом. В некоторых вариантах осуществления частота или вероятность испытать любую степень нейротоксичности, нейротоксичность степени 3 или выше, длительную нейротоксичность степень 3 или выше, степени 4 или выше или степени 5, составляет меньше 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% или меньше 95% соответствующей частоты и/или вероятности после введения готовых клеток, полученных альтернативным процессом.

[0447] В некоторых вариантах осуществления предложенные способы применяются в отношении процесса, который обеспечивает создание одной или более готовых композиций обогащенных Т-клеток, которые модифицированы для экспрессии рекомбинантного рецептора, с показателем эффективности по меньшей мере 85% (например, успешное создание композиции готовых клеток по меньшей мере из 85% из множества разных биологических образцов и/или композиций исходных клеток), например, с показателем эффективности от 92% до 94%. В некоторых вариантах осуществления процесс включает этапы инкубирования клеток при стимулирующих условиях; модификации стимулированных клеток для экспрессии или содержания рекомбинантного полинуклеотида, например, полинуклеотида, кодирующего рекомбинантный рецептор, такой как CAR; и культивирования модифицированных клеток до порогового количества, плотности или экспансии. В некоторых вариантах осуществления период и/или промежуток времени, требуемый для полного выполнения этих этапов, составляет от 8 до 15 дней или 9-13 дней. В некоторых вариантах осуществления процесс включает этапы сбора или получения биологического образца; выделения, отбора или обогащения исходных клеток из биологического образца; криоаморазивания и хранения исходных клеток; размораживания и/или инкубирования исходных клеток при стимулирующих условиях; модификации стимулированных клеток для экспрессии или содержания рекомбинантного полинуклеотида, например,

полинуклеотида, кодирующего рекомбинантный рецептор, такой как CAR; культивирования модифицированных клеток до порогового количества, плотности или экспансии; изготовления состава культивируемых клеток в готовой композиции; и криоаморазивания и хранения состава готовых клеток, пока клетки не будут выпущены для инфузии и/или введения субъекту. В некоторых вариантах осуществления процесс завершают в течение 19-23 дней от получения или забора биологического образца.

[0448] В некоторых вариантах осуществления предложенные способы применяют в отношении процесса, который обеспечивает создание одной или более композиций обогащенных Т-клеток, например, из одного источника, например, биологического образца и/или исходных композиций, выделенных, отобранных или обогащенных из биологического образца. В конкретных вариантах осуществления одна или более композиций обогащенных Т-клеток представляют собой или включают композицию обогащенных CD4<sup>+</sup> Т-клеток, которые содержат по меньшей мере 80% CD4<sup>+</sup> Т-клеток и по меньшей мере 50% CD4<sup>+</sup> Т-клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор. В некоторых вариантах осуществления одна или более композиций обогащенных Т-клеток включают композицию обогащенных CD4<sup>+</sup> Т и композицию обогащенных CD8<sup>+</sup> Т-клеток, содержащих по меньшей мере 80% CD8<sup>+</sup> Т-клеток и по меньшей мере 50% CD8<sup>+</sup> Т-клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор.

## II. РЕКОМБИНАНТНЫЕ БЕЛКИ

[0449] В некоторых вариантах осуществления клетки, которые обработаны, модифицированы и/или получены способами, предложенными в настоящем документе, содержат или экспрессируют или модифицированы для содержания или экспрессии рекомбинантного белка, такого как рекомбинантный рецептор, например, химерный антигенный рецептор (CAR) или Т-клеточный рецептор (TCR). В некоторых вариантах осуществления способы, предложенные в настоящем документе, обеспечивают получение и/или способны обеспечивать получение клеток или популяций, или композиций, содержащих клетки и/или обогащенных клетками, модифицированными для экспрессии или содержания рекомбинантного белка. В некоторых вариантах осуществления CD4<sup>+</sup> Т-клетки или популяции, или композиции CD4<sup>+</sup> Т-клеток обрабатывают, модифицируют и/или получают.

[0450] В некоторых вариантах осуществления клетки включают одну или более нуклеиновых кислот, введенных с помощью генной инженерии, и, таким образом, экспрессируют рекомбинантные или генетически сконструированные продукты таких нуклеиновых кислот. В некоторых вариантах осуществления перенос гена осуществляется сначала путем стимуляции клеток, например, путем объединения их со стимулом, который индуцирует ответ, такой как пролиферацию, выживание и/или активацию, например, при измерении по экспрессии цитокина или маркера активации, с последующей трансдукцией активированных клеток и экспансией в культуре до количеств, достаточных для клинического применения.

[0451] Клетки обычно экспрессируют рекомбинантные рецепторы, такие как

антигенные рецепторы, в том числе функциональные не-TCR антигенные рецепторы, например, химерные антигенные рецепторы (CAR) и другие антигенсвязывающие рецепторы, такие как трансгенные Т-клеточные рецепторы (TCR). Также рецепторы включают другие химерные рецепторы

#### **А. Химерные антигенные рецепторы**

[0452] В некоторых вариантах осуществления предложенных способов и применений, химерные рецепторы, такие как химерные антигенные рецепторы, содержат один или более доменов, которые объединяют лигандсвязывающий домен (например, антитело или фрагмент антитела), который обеспечивает специфичность в отношении требуемого антигена (например, опухолевого антигена), с внутриклеточными сигнальными доменами. В некоторых вариантах осуществления внутриклеточный сигнальный домен является активирующей внутриклеточной частью домена, такого как домен активации Т-клеток, обеспечивающий первичный сигнал активации. В некоторых вариантах осуществления внутриклеточный сигнальный домен содержит или дополнительно содержит костимулирующий сигнальный домен, способствующий эффекторным функциям. В некоторых вариантах осуществления химерные рецепторы, при генно-инженерном введении в иммунные клетки, могут модулировать активность Т-клеток, и, в некоторых случаях, могут модулировать дифференцировку или гомеостаз Т-клеток, что приводит к получению генетически модифицированных клеток с улучшенной длительностью существования, выживанием и/или персистенцией *in vivo*, например, для применения в методах адоптивной клеточной терапии.

[0453] Примерные антигенные рецепторы, в том числе CAR, и способы конструирования и введения таких рецепторов в клетки, включают описанные, например, в публикациях международных заявок WO200014257, WO2013126726, WO2012/129514, WO2014031687, WO2013/166321, WO2013/071154, WO2013/123061, публикациях заявок на патент США US2002131960, US2013287748, US20130149337, 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, и в европейской заявке на патент EP2537416, и/или описанные в Sadelain et al., *Cancer Discov.* 2013 April; 3(4): 388-398; Davila et al. (2013) *PLoS ONE* 8(4):e61338; Turtle et al., *Curr. Opin. Immunol.*, 2012 October; 24(5):633-39; Wu et al., *Cancer*, 2012 March 18(2):160-75. В некоторых аспектах антигенные рецепторы включают CAR, как описано в патенте США: 7,446,190, и рецепторы, описанные в публикации международной заявки: WO/2014055668 A1. Примеры CAR-рецепторов включают CAR, раскрытые в любой из указанных выше публикаций, таких как WO2014031687, US 8,339,645, US 7,446,179, US 2013/0149337, патент США: 7,446,190, патент США: 8,389,282, Kochenderfer et al., 2013, *Nature Reviews Clinical Oncology*, 10, 267-276 (2013); Wang et al. (2012) *J. Immunother.* 35(9): 689-701; и Brentjens et al., *Sci Transl Med.* 2013 5(177). Также см. WO2014031687, US 8,339,645, US 7,446,179, US 2013/0149337, патент США: 7,446,190 и патент США: 8,389,282..

[0454] Химерные рецепторы, такие как CAR, обычно включают внеклеточный

антигенсвязывающий домен, такой как часть молекулы антитела, обычно вариабельную область тяжелой цепи (VH) и/или вариабельную область легкой цепи (VL) антитела, например, scFv-фрагмент антитела.

[0455] В некоторых вариантах осуществления антиген, являющийся мишенью рецептора, представляет собой полипептид. В некоторых вариантах осуществления он представляет собой углевод или другую молекулу. В некоторых вариантах осуществления антиген селективно экспрессируется или повышенно экспрессируется на клетках заболевания или состояния, например, опухолевых или патогенных клетках, по сравнению с нормальными или нецелевыми клетками или тканями. В других вариантах осуществления антиген экспрессируется на нормальных клетках и/или экспрессируется на модифицированных клетках.

[0456] В некоторых вариантах осуществления антиген представляет собой или включает интегрин  $\alpha\nu\beta 6$  (интегрин  $\alpha\nu\beta 6$ ), антиген созревания В-клеток (BCMA), B7-H3, B7-H6, карбоангидразу 9 (CA9, также известную как CAIX или G250), раково-тестикулярный антиген, раковый/тестикулярный антиген 1B (CTAG, также известный как NY-ESO-1 и LAGE-2), раково-эмбриональный антиген (РЭА), циклин, циклин A2, хемокиновый лиганд с C-C-мотивом 1 (CCL-1), CD19, CD20, CD22, CD23, CD24, CD30, CD33, CD38, CD44, CD44v6, CD44v7/8, CD123, CD133, CD138, CD171, хондроитинсульфат протеогликан 4 (CSPG4), белок эпидермального фактора роста (EGFR), мутантный рецептор эпидермального фактора роста III типа (EGFR vIII), эпителиальный гликопротеин 2 (EPG-2), эпителиальный гликопротеин 40 (EPG-40), эфринB2, рецептор эфрина A2 (EPHa2), эстрогеновый рецептор, Fc-рецептор-подобный 5 (FCRL5; также известный как гомолог Fc-рецептора 5 или FCRH5), эмбриональный рецептор ацетилхолина (фетальный AchR), фолатсвязывающий белок (FBP), альфа-рецептор фолата, ганглиозид GD2, O-ацетилированный GD2 (OGD2), ганглиозид GD3, гликопротеин 100 (gp100), глипикан-3 (GPC3), G-белок-сопряженный рецептор 5D (GPRC5D), Her2/neu (рецепторную тирозинкиназу erb-B2), Her3 (erb-B3), Her4 (erb-B4), димеры erbB, человеческий высокомолекулярный меланома-ассоциированный антиген (HMW-MAA), поверхностный антиген гепатита В, человеческий лейкоцитарный антиген A1 (HLA-A1), человеческий лейкоцитарный антиген A2 (HLA-A2), альфа-рецептор IL-22 (IL-22R $\alpha$ ), альфа-рецептор IL-13 2 (IL-13R $\alpha 2$ ), рецептор с доменом вставки киназы (kdr), легкую цепь каппа, молекулу клеточной адгезии L1 (L1-CAM), CE7 эпитоп L1-CAM, член А семейства содержащих богатые лейцином повторы белков 8 (LRRC8A), Льюис Y, меланома-ассоциированный антиген (MAGE)-A1, MAGE-A3, MAGE-A6, MAGE-A10, мезотелин (MSLN), с-Met, цитомегаловирус мышей (CMV), муцин 1 (MUC1), MUC16, лиганды члена D группы 2 рецепторов NK-клеток (NKG2D), мелан А (MART-1), невральная молекула клеточной адгезии (NCAM), онкофетальный антиген, предпочтительно экспрессируемый антиген меланомы (PRAME), рецептор прогестерона, простатический специфический антиген, простатический антиген стволовых клеток (PSCA), простатический специфический мембранный антиген (PSMA), подобный

рецепторной тирозинкиназе орфанный рецептор 1 (ROR1), сурвивин, трофобластический гликопротеин (TPBG, также известный как 5T4), опухолеассоциированный гликопротеин 72 (TAG72), тирозиназа-связанный белок 1 (TRP1, также известный как TYRP1 или gp75), тирозиназа-связанный белок 2 (TRP2, также известный как допахром таутомераза, допахром дельта-изомераза или DCT), рецептор фактора роста эндотелия сосудов (VEGFR), рецептор фактора роста эндотелия сосудов 2 (VEGFR2), белок опухоли Вильмса 1 (WT-1), патоген-специфический или патоген-экспрессируемый антиген или антиген, ассоциированный с универсальной меткой, и/или биотинилированные молекулы и/или молекулы, экспрессируемые ВИЧ, ВГС, ВГВ или другими патогенами. Антигены, являющиеся мишенью рецепторов, в некоторых вариантах осуществления включают антигены, ассоциированные с В-клеточным злокачественным новообразованием, такие как любые из известных В-клеточных маркеров. В некоторых вариантах осуществления антиген представляет собой или включает CD20, CD19, CD22, ROR1, CD45, CD21, CD5, CD33, Ig-каппа, Ig-лямбда, CD79a, CD79b или CD30.

[0457] В некоторых вариантах осуществления антиген представляет собой или включает патоген-специфический или патоген-экспрессируемый антиген. В некоторых вариантах осуществления антиген является вирусным антигеном (таким как вирусный антиген из ВИЧ, ВГС, ВГВ и т.д.), бактериальными антигенами и/или паразитарными антигенами. Антигены, являющиеся мишенями рецепторов, в некоторых вариантах осуществления включают антигены, ассоциированные с В-клеточным злокачественным новообразованием, такие как любые из известных В-клеточных маркеров. В некоторых вариантах осуществления антиген, являющийся мишенью рецептора, представляет собой CD20, CD19, CD22, ROR1, CD45, CD21, CD5, CD33, Ig-каппа, Ig-лямбда, CD79a, CD79b или CD30.

[0458] В некоторых вариантах осуществления антиген или антигенсвязывающий домен представляет собой CD19. В некоторых вариантах осуществления scFv содержит VH и VL, полученные из антитела или фрагмента антитела, специфичного к CD19. В некоторых вариантах осуществления антитело или фрагмент антитела, связывающий CD19, является мышинным антителом, таким как FMC63 и SJ25C1. В некоторых вариантах осуществления антитело или фрагмент антитела является человеческим антителом, например, как описано в патентной публикации США 2016/0152723.

[0459] Термин "антитело" используется в настоящем документе в самом широком смысле и включает поликлональные и моноклональные антитела, в том числе интактные антитела и функциональные (антигенсвязывающие) фрагменты антител, включая антигенсвязывающие (Fab) фрагменты, F(ab')<sub>2</sub>-фрагменты, Fab-фрагменты, Fv-фрагменты, фрагменты рекомбинантных IgG (rIgG), переменные области тяжелой цепи (VH), способные специфично связывать антиген, одноцепочечные фрагменты антител, включающие одноцепочечные переменные фрагменты (scFv), и однодоменные фрагменты антител (например, sdAb, sdFv, нанотело). Термин охватывает генетически сконструированные и/или иным образом модифицированные формы иммуноглобулинов,

такие как интратела, пептитела, химерные антитела, полностью человеческие антитела, гуманизированные антитела и гетероконъюгаты антител, мультиспецифичные, например, биспецифичные или триспецифичные, антитела, диатела, триатела и тетратела, тандемные ди-scFv, тандемные три-scFv. Если не указано иное, термин "антитело" следует понимать как охватывающий соответствующие функциональные фрагменты антител, также именуемые в настоящем документе "антигенсвязывающими фрагментами". Термин также охватывает интактные или полноразмерные антитела, в том числе антитела любого класса или субкласса, включая IgG и его субклассы, IgM, IgE, IgA и IgD.

[0460] Термины "определяющая комплементарность область" и "CDR", синонимом которых является "гипервариабельная область" или "HVR", как известно в области техники, относятся к несплошным аминокислотным последовательностям в вариабельных областях антител, которые придают антигенную специфичность и/или аффинность связывания. Как правило, в каждой вариабельной области тяжелой цепи присутствуют три CDR-области (CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3), и три CDR-области - в каждой вариабельной области легкой цепи (CDR-L1, CDR-L2, CDR-L3). Как известно из уровня техники, "каркасные области" и "FR" относятся к не-CDR участкам вариабельных областей тяжелой и легкой цепей. Как правило, в каждой полноразмерной вариабельной области тяжелой цепи (FR-H1, FR-H2, FR-H3 и FR-H4) содержится четыре FR, и в каждой полноразмерной вариабельной области легкой цепи (FR-L1, FR-L2, FR-L3 и FR-L4) - четыре FR.

[0461] Точные границы аминокислотных последовательностей данных CDR или FR могут быть легко определены при использовании любой из хорошо известных схем, в том числе описанных в публикации Kabat et al. (1991), "Sequences of Proteins of Immunological Interest", 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (схема нумерации "Кэбата"); Al-Lazikani et al., (1997) JMB 273,927-948 (схема нумерации "Чотиа"); MacCallum et al., J. Mol. Biol. 262:732-745 (1996), "Antibody-antigen interactions: Contact analysis and binding site topography", J. Mol. Biol. 262, 732-745 ("Контактная" схема нумерации); Lefranc MP et al., "IMGT unique numbering for immunoglobulin and T cell receptor variable domains and Ig superfamily V-like domains", Dev Comp Immunol, 2003 Jan;27(1):55-77 (схема нумерации "IMGT"); Honegger A and Plückthun A, "Yet another numbering scheme for immunoglobulin variable domains: an automatic modeling and analysis tool", J Mol Biol, 2001 Jun 8; 309(3):657-70, (схема нумерации "Aho"); и Martin et al., "Modeling antibody hypervariable loops: a combined algorithm", PNAS, 1989, 86(23):9268-9272, (схема нумерации "AbM").

[0462] Границы данных CDR или FR могут варьировать в зависимости от схемы, используемой для идентификации. Например, схема Кэбата основана на структурных выравниваниях, тогда как схема Чотиа основана на структурной информации. Нумерация по схема Кэбата и Чотиа основана на наиболее распространенных длинах последовательностей областей антител, где вставки, обозначенные буквами вставки, например "30a", и делеции присутствуют в некоторых антителах. Эти две схемы

помещают некоторые вставки и делеции ("инделлы") в разные положения, что приводит к разной нумерации. Контактная схема основана на анализе сложных кристаллических структур и во многих отношениях аналогична схеме нумерации Чотиа. Схема AbM представляет собой компромисс между определениями Кэбата и Чотиа, и основана на определении, используемом в программе для моделирования антител AbM, разработанной Oxford Molecular.

[0463] В **Таблице 1**, ниже, перечислены примерные границы положений CDR-L1, CDR-L2, CDR-L3 и CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, идентифицированных в схемах Кэбата, Чотиа, AbM и Контактной схеме, соответственно. Для CDR-H1 нумерация остатков перечислена при использовании схем нумерации Кэбата и Чотиа. FR-области расположены между CDR-областями, например, FR-L1 расположена перед CDR-L1, FR-L2 расположена между CDR-L1 и CDR-L2, FR-L3 расположена между CDR-L2 и CDR-L3, и т.д. Следует отметить, что, поскольку в показанной нумерации Кэбата вставки помещены в положения H35A и H35B, конец петли CDR-H1 Чотиа при нумерации с использованием показанной системы нумерации Кэбата варьирует между H32 и H34, в зависимости от длины петли.

**Таблица 1.** Границы CDR-областей согласно различным схемам нумерации.

<b>CDR</b>	<b>Кэбат</b>	<b>Чотиа</b>	<b>AbM</b>	<b>Контактная</b>
CDR-L1	L24-L34	L24-L34	L24-L34	L30-L36
CDR-L2	L50-L56	L50-L56	L50-L56	L46-L55
CDR-L3	L89-L97	L89-L97	L89-L97	L89-L96
CDR-H1 (нумерация Кэбата <sup>1</sup> )	H31-H35B	H26-H32..34	H26-H35B	H30-H35B
CDR-H1 (нумерация Чотиа <sup>2</sup> )	H31-H35	H26-H32	H26-H35	H30-H35
CDR-H2	H50-H65	H52-H56	H50-H58	H47-H58
CDR-H3	H95-H102	H95-H102	H95-H102	H93-H101

1 - Kabat et al. (1991), "Sequences of Proteins of Immunological Interest", 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD

2 - Al-Lazikani et al., (1997) JMB 273,927-948

[0464] Таким образом, если не определено иное, следует понимать, что "CDR" или "определяющая комплементарность область" или отдельные указанные CDR (например, CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3) данного антитела или его области, такой как переменная область, охватывают некоторую (или конкретную) определяющую комплементарность область, определенную согласно любой из вышеуказанных схем или других известных схем. Например, если указано, что конкретная CDR-область (например, CDR-H3) содержит аминокислотную последовательность соответствующей CDR в данной аминокислотной последовательности V<sub>H</sub> или V<sub>L</sub>-области, подразумевается, что такая CDR имеет последовательность соответствующей CDR (например, CDR-H3) в переменной области, как определено согласно любой из вышеуказанных схем или других известных схем. В некоторых вариантах осуществления указаны конкретные CDR-последовательности. Примерные CDR-последовательности представленных антител

описаны при использовании различных схем нумерации, хотя подразумевается, что представленное антитело может включать CDR-области, описанные согласно любой из других вышеуказанных схем нумерации или других схем нумерации, известных специалисту в данной области.

[0465] Аналогичным образом, если не определено иное, следует понимать, FR или отдельная определенная FR-область(и) (например, FR-H1, FR-H2, FR-H3, FR-H4) данного антитела или его области, такой как переменная область, охватывает некоторую (или определенную) каркасную область, определенную согласно любой из известных схем. В некоторых случаях схему идентификации конкретной CDR, FR, или FR-областей или CDR-областей указывают, например, CDR, как определено согласно методу Кэбата, Чотиа, AbM или Контактному методу, или другими известными схемам. В других случаях приведена конкретная аминокислотная последовательность CDR или FR.

[0466] Термин "переменная область" или "переменный домен" относится к домену тяжелой или легкой цепи антитела, который участвует в связывании антитела с антигеном. Переменные области тяжелой цепи и легкой цепи ( $V_H$  и  $V_L$ , соответственно) нативного антитела обычно имеют сходные структуры, причем каждый домен включает четыре консервативные каркасные области (FR) и три CDR (см., например, Kindt et al. *Kuby Immunology*, 6th ed., W.H. Freeman and Co., стр. 91 (2007)). Одно  $V_H$  или  $V_L$  домена может быть достаточно для придания антигенсвязывающей специфичности. Кроме того, антитела, связывающие конкретный антиген, могут быть выделены с помощью  $V_H$  или  $V_L$  домена из антитела, которое связывает антиген, для скрининга библиотеки комплементарных  $V_L$  или  $V_H$  доменов, соответственно. См., например, Portolano et al., *J. Immunol.* 150:880-887 (1993); Clarkson et al., *Nature* 352:624-628 (1991).

[0467] Антитела, включенные в предложенные CAR, включают фрагменты антител. "Фрагмент антитела" или "антигенсвязывающий фрагмент" относится к молекуле, отличной от интактного антитела, которая включает часть интактного антитела, которая связывает антиген, с которым связывается интактное антитело. Примеры фрагментов антител включают, без ограничения перечисленными, Fv, Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')<sub>2</sub>; диатела; линейные антитела; переменные области тяжелой цепи ( $V_H$ ), одноцепочечные молекулы антител, такие как scFv и однодоменные антитела, включающие только  $V_H$  область; и мультиспецифичные антитела, сформированные из фрагментов антител. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен в предложенных CAR представляет собой или включает фрагмент антитела, содержащий переменную область тяжелой цепи ( $V_H$ ) и переменную область легкой цепи ( $V_L$ ). В конкретных вариантах осуществления антитела представляют собой одноцепочечные фрагменты антител, содержащие переменную ( $V_H$ ) область тяжелой цепи и/или переменную ( $V_L$ ) область легкой цепи, такую как scFv.

[0468] В некоторых вариантах осуществления scFv получен из FMC63. FMC63 в общем относится к моноклональному мышинному IgG1 антителу, индуцированному против клеток Nalm-1 и -16, экспрессирующих CD19 человеческого происхождения (Ling,



N. R., et al. (1987). Leucocyte typing III. 302). В некоторых вариантах осуществления антитело FMC63 включает CDRH1 и H2, представленные в SEQ ID NO: 38 и 39, соответственно, и CDRH3, представленную в SEQ ID NO: 40 или 54, и CDRL1, представленную в SEQ ID NO: 35, и CDRL2, представленную в SEQ ID NO: 36 или 55, и CDRL3, представленную в SEQ ID NO: 37 или 34. В некоторых вариантах осуществления антитело FMC63 включает переменную область тяжелой цепи ( $V_H$ ), включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 41, и переменную область легкой цепи ( $V_L$ ), включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 42.

[0469] В некоторых вариантах осуществления scFv включает переменную легкую цепь, содержащую последовательность CDRL1 SEQ ID NO:35, последовательность CDRL2 SEQ ID NO:36 и последовательность CDRL3 SEQ ID NO:37, и/или переменную тяжелую цепь, содержащую последовательность CDRH1 SEQ ID NO:38, последовательность CDRH2 SEQ ID NO:39 и последовательность CDRH3 SEQ ID NO:40. В некоторых вариантах осуществления scFv включает переменную область тяжелой цепи, представленную в SEQ ID NO:41, и переменную область легкой цепи, представленную в SEQ ID NO:42. В некоторых вариантах осуществления переменная тяжелая и переменная легкая цепи соединены линкером. В некоторых вариантах осуществления линкер представлен в SEQ ID NO:56. В некоторых вариантах осуществления scFv включает, в указанном порядке,  $V_H$ , линкер и  $V_L$ . В некоторых вариантах осуществления scFv включает, в указанном порядке,  $V_L$ , линкер и  $V_H$ . В некоторых вариантах осуществления scFv кодируется последовательностью нуклеотидов, представленной в SEQ ID NO:57, или последовательностью, которая демонстрирует по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичность последовательности с SEQ ID NO:57. В некоторых вариантах осуществления scFv включает последовательность аминокислот, представленную в SEQ ID NO:43, или последовательность, которая демонстрирует по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичность последовательности с SEQ ID NO:43.

[0470] В некоторых вариантах осуществления scFv получен из SJ25C1. SJ25C1 является моноклональным мышинным IgG1 антителом, индуцированным против клеток Nalm-1 и -16, экспрессирующих CD19 человеческого происхождения (Ling, N. R., et al. (1987). Leucocyte typing III. 302). В некоторых вариантах осуществления антитело SJ25C1 включает CDRH1, H2 и H3, представленные в SEQ ID NO: 47-49, соответственно, и последовательности CDRL1, L2 и L3, представленные в SEQ ID NO: 44-46, соответственно. В некоторых вариантах осуществления антитело SJ25C1 включает переменную область тяжелой цепи ( $V_H$ ), включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 50, и переменную область легкой цепи ( $V_L$ ), включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 51.

[0471] В некоторых вариантах осуществления scFv включает переменную легкую цепь, содержащую последовательность CDRL1 SEQ ID NO:44, последовательность

CDRL2 SEQ ID NO: 45 и последовательность CDRL3 SEQ ID NO:46, и/или переменную тяжелую цепь, содержащую последовательность CDRH1 SEQ ID NO:47, последовательность CDRH2 SEQ ID NO:48 и последовательность CDRH3 SEQ ID NO:49. В некоторых вариантах осуществления scFv включает переменную область тяжелой цепи, представленную в SEQ ID NO:50, и переменную область легкой цепи, представленную в SEQ ID NO:51. В некоторых вариантах осуществления переменная тяжелая цепь и переменная легкая цепь соединены линкером. В некоторых вариантах осуществления линкер представлен в SEQ ID NO:52. В некоторых вариантах осуществления scFv включает, в указанном порядке, V<sub>H</sub>, линкер и V<sub>L</sub>. В некоторых вариантах осуществления scFv включает, в указанном порядке, V<sub>L</sub>, линкер и V<sub>H</sub>. В некоторых вариантах осуществления scFv включает последовательность аминокислот, представленную в SEQ ID NO:53, или последовательность, которая демонстрирует по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичность последовательности с SEQ ID NO:53.

[0472] В некоторых вариантах осуществления антиген или антигенсвязывающий домен представляет собой ВСМА. В некоторых вариантах осуществления scFv содержит V<sub>H</sub> и V<sub>L</sub>, полученные из антитела или фрагмента антитела, специфичного к ВСМА. В некоторых вариантах осуществления антитело или фрагмент антитела, который связывает ВСМА, представляет собой или содержит V<sub>H</sub> и V<sub>L</sub> из антитела или фрагмента антитела, представленного в публикациях Международных заявок WO 2016/090327 и WO 2016/090320.

[0473] В некоторых вариантах осуществления антиген или антигенсвязывающий домен представляет собой GPRC5D. В некоторых вариантах осуществления scFv содержит V<sub>H</sub> и V<sub>L</sub>, полученные из антитела или фрагмента антитела, специфичного к GPRC5D. В некоторых вариантах осуществления антитело или фрагмент антитела, который связывает GPRC5D, представляет собой или содержит V<sub>H</sub> и V<sub>L</sub> из антитела или фрагмента антитела, представленного в публикациях Международных заявок WO 2016/090329 и WO 2016/090312.

[0474] В некоторых вариантах осуществления антиген представляет собой CD20. В некоторых вариантах осуществления scFv содержит V<sub>H</sub> и V<sub>L</sub>, полученные из антитела или фрагмента антитела, специфичного к CD20. В некоторых вариантах осуществления антитело или фрагмент антитела, который связывает CD20, является антителом, которое представляет собой или получено из Ритуксимаба, такого как scFv Ритуксимаба.

[0475] В некоторых вариантах осуществления антиген представляет собой CD22. В некоторых вариантах осуществления scFv содержит V<sub>H</sub> и V<sub>L</sub>, полученные из антитела или фрагмента антитела, специфичного к CD22. В некоторых вариантах осуществления антитело или фрагмент антитела, который связывает CD22, является антителом, которое представляет собой или получено из m971, такого как scFv m971.

[0476] В некоторых вариантах осуществления 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 вариантах осуществления антитело или фрагмент включает scFv.

[0477] В некоторых вариантах осуществления полученная из антитела часть рекомбинантного рецептора, например, CAR, дополнительно включает по меньшей мере часть константной области иммуноглобулина, такую как шарнирная область, например, шарнирная область IgG4, и/или CH1/CL и/или Fc-область. В некоторых вариантах осуществления константная область или часть получена из человеческого IgG, такого как IgG4 или IgG1. В некоторых аспектах часть константной области служит в качестве спейсерной области между антиген-распознающим компонентом, например scFv, и трансмембранным доменом. Спейсер может иметь длину, которая обеспечивает повышенную реактивность клетки после связывания антигена, по сравнению с реактивностью в отсутствие спейсера. Примерные спейсеры включают, без ограничения перечисленными, спейсеры, описанные в Hudecek et al. (2013) Clin. Cancer Res., 19:3153, публикации Международной заявки номер WO2014031687, патенте США 8,822,647 или опубликованной заявке US2014/0271635.

[0478] В некоторых вариантах осуществления константная область или часть получена из человеческого IgG, такого как IgG4 или IgG1. В некоторых вариантах осуществления спейсер имеет последовательность ESKYGPPCPPCP (представленную в SEQ ID NO: 1), и кодируется последовательностью, представленной в SEQ ID NO:2. В некоторых вариантах осуществления спейсер имеет последовательность, представленную в SEQ ID NO:3. В некоторых вариантах осуществления спейсер имеет последовательность, представленную в SEQ ID NO:4. В некоторых вариантах осуществления константная область или часть получена из IgD. В некоторых вариантах осуществления спейсер имеет последовательность, представленную в SEQ ID NO:5. В некоторых вариантах осуществления спейсер имеет последовательность аминокислот, которая демонстрирует по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или большую идентичность последовательности с любой из SEQ ID NO: 1, 3, 4 или 5. В некоторых вариантах осуществления спейсер имеет последовательность, представленную в SEQ ID NO: 25-33. В некоторых вариантах осуществления спейсер имеет последовательность аминокислот, которая демонстрирует по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или большую идентичность последовательности с любой из SEQ ID NO: 25-33.

[0479] В некоторых вариантах осуществления антигенный рецептор включает внутриклеточный домен, связанный напрямую или непрямо с внеклеточным доменом. В некоторых вариантах осуществления химерный антигенный рецептор включает трансмембранный домен, соединяющий внеклеточный домен и внутриклеточный сигнальный домен. В некоторых вариантах осуществления внутриклеточный сигнальный домен включает ITAM. Например, в некоторых аспектах, антигенраспознающий домен (например, внеклеточный домен) обычно соединен с одним или более внутриклеточными

сигнальными компонентами, такими как сигнальные компоненты, которые имитируют активацию через комплекс антигенного рецептора, такой как комплекс TCR, в случае CAR, и/или сигнал через другой рецептор клеточной поверхности. В некоторых вариантах осуществления химерный рецептор включает трансмембранный домен, связанный или слитый между внеклеточным доменом (например, scFv) и внутриклеточным сигнальным доменом. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий компонент (например, антитело) связан с одним или более трансмембранными и внутриклеточными сигнальными доменами.

[0480] В одном варианте осуществления используется трансмембранный домен, который естественно связан с одним из доменов в рецепторе, например, CAR. В некоторых случаях трансмембранный домен выбран или модифицирован путем аминокислотной замены, чтобы предотвратить связывание таких доменов с трансмембранными доменами таких же или других поверхностных мембранных белков, чтобы свести к минимуму взаимодействия с другими членами рецепторного комплекса.

[0481] Трансмембранный домен в некоторых вариантах осуществления получен из природного или из синтетического источника. Когда источник является природным, домен в некоторых аспектах получен из любого мембраносвязанного или трансмембранного белка. Трансмембранные области включают области, полученные из (т.е. включают, по меньшей мере, трансмембранную область(и)) альфа, бета или дзета-цепи Т-клеточного рецептора, CD28, CD3 эпсилон, CD45, CD4, CD5, CD8, CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137, CD154. В альтернативе трансмембранный домен в некоторых вариантах осуществления является синтетическим. В некоторых аспектах синтетический трансмембранный домен включает преимущественно гидрофобные остатки, такие как лейцин и валин. В некоторых аспектах триплет фенилаланина, триптофана и валина будет присутствовать на каждом конце синтетического трансмембранного домена. В некоторых вариантах осуществления связь осуществляется посредством линкеров, спейсеров и/или трансмембранного домена(ов). В некоторых аспектах трансмембранный домен содержит трансмембранную часть CD28.

[0482] В некоторых вариантах осуществления внеклеточный домен и трансмембранный домен могут быть соединены напрямую или непрямо. В некоторых вариантах осуществления внеклеточный домен и трансмембранный соединены спейсером, таким как любой спейсер, описанный в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления рецептор содержит внеклеточную часть молекулы, из которой получен трансмембранный домен, такую как внеклеточная часть CD28.

[0483] Внутриклеточные сигнальные домены включают те, которые имитируют или приближенно воспроизводят сигнал через природный антигенный рецептор, сигнал через такой рецептор в сочетании с костимулирующим рецептором и/или сигнал только через один костимулирующий рецептор. В некоторых вариантах осуществления короткий олиго- или полипептидный линкер, например, линкер длиной от 2 до 10 аминокислот, такой как линкер, содержащий глицины и серины, например, глицин-сериновый дуплет,

присутствует и образует связь между трансмембранным доменом и цитоплазматическим сигнальным доменом CAR.

[0484] Активация Т-клеток в некоторых аспектах описывают как опосредованную двумя классами цитоплазматических сигнальных последовательностей: последовательности, которые инициируют антигензависимую первичную активацию через TCR (первичные цитоплазматические сигнальные последовательности), и последовательности, которые действуют по антигеннезависимому пути, обеспечивая вторичный или костимулирующий сигнал (вторичные цитоплазматические сигнальные последовательности). В некоторых аспектах CAR включает один или оба таких сигнальных компонента.

[0485] Рецептор, например CAR, обычно включает по меньшей мере один внутриклеточный сигнальный компонент или компоненты. В некоторых аспектах CAR включает первичную цитоплазматическую сигнальную последовательность, которая регулирует первичную активацию комплекса TCR. Первичные цитоплазматические сигнальные последовательности, действующие стимулирующим образом, могут содержать сигнальные мотивы, которые известны как иммунорецепторный тирозиновый активирующие мотивы или ITAM. Примеры ITAM, содержащего первичные цитоплазматические сигнальные последовательности, включают ITAM, полученные из дзета-цепи CD3, FcR-гамма, CD3-гамма, CD3-дельта и CD3-эпсилон. В некоторых вариантах осуществления цитоплазматическая сигнальная молекула(ы) в CAR содержит цитоплазматический сигнальный домен, его часть или последовательность, полученную из CD3-дзета.

[0486] В некоторых вариантах осуществления рецептор включает внутриклеточный компонент комплекса TCR, такой как цепь CD3 TCR, которая опосредует активацию и цитотоксичность Т-клеток, например, дзета-цепь CD3. Таким образом, в некоторых аспектах антигенсвязывающая часть связана с одним или более сигнальными модулями клетки. В некоторых вариантах осуществления сигнальные модули клетки включают трансмембранный домен CD3, внутриклеточные сигнальные домены CD3 и/или другие трансмембранные домены CD3. В некоторых вариантах осуществления рецептор, например CAR, дополнительно включает часть одной или более дополнительных молекул, таких как Fc-рецептор  $\gamma$ , CD8, CD4, CD25 или CD16. Например, в некоторых аспектах, CAR или другой химерный рецептор включает химерную молекулу между CD3-дзета (CD3- $\zeta$ ) или Fc-рецептором  $\gamma$  и CD8, CD4, CD25 или CD16.

[0487] В некоторых вариантах осуществления при связывании CAR или другого химерного рецептора, цитоплазматический домен или внутриклеточный сигнальный домен рецептора активирует по меньшей мере одну из нормальных эффекторных функций или ответы иммунной клетки, например, Т-клетки, модифицированной для экспрессии CAR. Например, в некоторых контекстах CAR индуцирует функцию Т-клеток, такую как цитолитическую активность или активность Т-хелперов, такую как секреция цитокинов или других факторов. В некоторых вариантах осуществления усеченная часть

внутриклеточного сигнального домена компонента антигенного рецептора или костимулирующая молекула используется вместо интактной иммуностимуляторной цепи, например, если она преобразует сигнал эффекторной функции. В некоторых вариантах осуществления внутриклеточный сигнальный домен или домены включают цитоплазматические последовательности Т-клеточного рецептора (TCR), и в некоторых аспектах также последовательности корецепторов, которые в естественном контексте действуют совместно с такими рецепторами, иницируя сигнальную трансдукцию после связывания с антигенным рецептором.

[0488] В контексте природного TCR полная активация обычно требует не только сигнализации через TCR, но также и костимулирующего сигнала. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления, чтобы вызвать полную активацию, компонент для генерации вторичного или костимулирующего сигнала также включают в CAR. В других вариантах осуществления 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.

[0489] В некоторых вариантах осуществления химерный антигенный рецептор содержит внутриклеточный домен Т-клеточной костимулирующей молекулы. В некоторых вариантах осуществления CAR включает сигнальный домен и/или трансмембранную часть костимулирующего рецептора, такого как CD28, 4-1BB, OX40, DAP10 и ICOS. В некоторых аспектах один и тот же CAR включает активирующий и костимулирующий компоненты. В некоторых вариантах осуществления химерный антигенный рецептор содержит внутриклеточный домен, полученный из Т-клеточной костимулирующей молекулы, или его функциональный вариант, например, между трансмембранным доменом и внутриклеточным сигнальным доменом. В некоторых аспектах Т-клеточная костимулирующая молекула представляет собой CD28 или 41BB.

[0490] В некоторых вариантах осуществления активирующий домен включают в один CAR, тогда как костимулирующий компонент предоставляет другой CAR, распознающий другой антиген. В некоторых вариантах осуществления CAR-рецепторы включают активирующие или стимулирующие CAR-рецепторы, костимулирующие CAR-рецепторы, которые экспрессируются на одной клетке (см. WO2014/055668). В некоторых аспектах клетки включают один или более стимулирующих или активирующих CAR и/или костимулирующий CAR. В некоторых вариантах осуществления клетки дополнительно включают ингибирующие CAR-рецепторы (iCAR, см. Fedorov et al., *Sci. Transl. Medicine*, 5(215) (декабрь 2013)), такие как CAR, распознающий антиген, отличный от антигена, ассоциированного с и/или специфического для заболевания или состояния, посредством которого активирующий сигнал, доставляемый посредством CAR-рецептора, направленно воздействующего на заболевание, уменьшается или ингибируется при связывании ингибирующего CAR со своим лигандом, например, для уменьшения нецелевых эффектов.

[0491] В некоторых вариантах осуществления два рецептора индуцируют,

соответственно, активирующий и ингибирующий сигнал для клетки, при этом связывание одного из рецепторов с его антигеном активирует клетку или индуцирует ответ, однако связывание второго ингибирующего рецептора с его антигеном вызывает сигнал, который подавляет или ослабляет этот ответ. Примерами являются комбинации активирующих CAR-рецепторов и ингибирующих CAR-рецепторов (iCAR). Такая стратегия может использоваться, например, для уменьшения вероятности нецелевых эффектов в контексте, в котором активирующий CAR связывает антиген, экспрессируемый при заболевании или состоянии, но который также экспрессируется на нормальных клетках, при этом ингибирующий рецептор связывается с отдельным антигеном, который экспрессируется на нормальных клетках, но не экспрессируется на клетках, ассоциированных с заболеванием или состоянием.

[0492] В некоторых аспектах химерный рецептор представляет собой или включает ингибирующий CAR (например, iCAR) и включает внутриклеточные компоненты, которые ослабляют или подавляют иммунный ответ, такие как ITAM, и/или вызванный стимуляцией ответ в клетке. Примерами таких внутриклеточных сигнальных компонентов являются компоненты, обнаруженные на молекулах иммунных контрольных точек, включая PD-1, CTLA4, LAG3, BTLA, OX2R, TIM-3, TIGIT, LAIR-1, рецепторы PGE2, EP2/4-аденозиновые рецепторы, включая A2AR. В некоторых аспектах модифицированная клетка включает ингибирующий CAR, включающий сигнальный домен из или полученный из такой ингибирующей молекулы, при этом он служит для ослабления ответа клетки, например, который индуцирован активирующим и/или костимулирующим CAR.

[0493] В некоторых вариантах осуществления внутриклеточный сигнальный домен включает трансмембранный и сигнальный домен CD28, соединенный с внутриклеточным доменом CD3 (например, CD3-дзета). В некоторых вариантах осуществления внутриклеточный сигнальный домен включает химерные костимулирующие домены CD28 и CD137 (4-1BB, TNFRSF9), соединенные с внутриклеточным доменом CD3-дзета.

[0494] В некоторых вариантах осуществления CAR включает один или более, например два или больше, костимулирующих доменов и активирующий домен, например первичный активирующий домен, в цитоплазматической части. Примерные CAR-рецепторы включают внутриклеточные компоненты CD3-дзета, CD28 и 4-1BB.

[0495] В некоторых вариантах осуществления антигенный рецептор дополнительно включает маркер и/или клетки, экспрессирующие CAR, или другой антигенный рецептор дополнительно включает суррогатный маркер, такой как маркер клеточной поверхности, который может использоваться для подтверждения трансдукции или модификации клетки с целью экспрессии рецептора. В некоторых аспектах маркер включает весь или часть (например, усеченную форму) CD34, NGFR или рецептора эпидермального фактора роста, такую как усеченный вариант такого рецептора клеточной поверхности (например, tEGFR). В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота, кодирующая маркер, функционально связана с полинуклеотидом, кодирующим линкерную

последовательность, такую как расщепляемую линкерную последовательность, например, T2A. Например, маркер и, необязательно, линкерная последовательность могут быть любыми, как раскрыто в опубликованной заявке WO2014031687. Например, маркер может быть усеченным EGFR (tEGFR), то есть, необязательно, соединенным с линкерной последовательностью, такой как расщепляемая линкерная последовательность T2A.

[0496] Примерный полипептид усеченного EGFR (например, tEGFR) включает последовательность аминокислот, представленную в SEQ ID NO: 7 или 16, или последовательность аминокислот, которая демонстрирует по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или большую идентичность последовательности с SEQ ID NO: 7 или 16. Примерная линкерная последовательность линкера T2A включает последовательность аминокислот, представленную в SEQ ID NO: 6 или 17, или последовательность аминокислот, которая демонстрирует по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или большую идентичность последовательности с SEQ ID NO: 6 или 17.

[0497] В некоторых вариантах осуществления маркер является молекулой, например, белком клеточной поверхности, который обычно не присутствует на Т-клетках или обычно не присутствует на поверхности Т-клеток, или его частью. В некоторых вариантах осуществления молекула является чужой молекулой, например, чужим белком, т.е. белком, который не распознается как "свой" иммунной системой организма-хозяина, которому будут адоптивно переносить клетки.

[0498] В некоторых вариантах осуществления маркер не служит никакой терапевтической функции и/или не оказывает другого влияния помимо применения в качестве маркера для генной инженерии, например, для отбора успешно модифицированных клеток. В других вариантах осуществления маркер может быть терапевтической молекулой или молекулой, иным образом проявляющей некоторый желаемый эффект, такой как лиганд для клетки, существующей *in vivo*, такой как костимулирующая молекула или молекула иммунной контрольной точки, для усиления и/или ослабления ответа клеток после адоптивного переноса и контакта с лигандом.

[0499] В некоторых случаях CAR-рецепторы именуется CAR-рецепторами первого, второго и/или третьего поколения. В некоторых аспектах CAR первого поколения является рецептором, который при связывании антигена дает только сигнал, индуцированный цепью CD3; в некоторых аспектах CAR второго поколения является рецептором, который дает такой сигнал и костимулирующий сигнал, такой как CAR, включающий внутриклеточный сигнальный домен из костимулирующего рецептора, такого как CD28 или CD137; в некоторых аспектах CAR третьего поколения является рецептором, включающим множество костимулирующих доменов разных костимулирующих рецепторов.

[0500] Например, в некоторых вариантах осуществления, CAR содержит антитело, например, фрагмент антитела, такой как scFv, специфичный к антигену, включая любой,



как описано, трансмембранный домен, который представляет собой или содержит трансмембранную часть CD28 или ее функциональный вариант, и внутриклеточный сигнальный домен, содержащий сигнальную часть CD28 или ее функциональный вариант и сигнальную часть CD3-дзета или ее функциональный вариант. В некоторых вариантах осуществления CAR содержит антитело, например, фрагмент антитела, такой как scFv, специфичный к антигену, включая любой, как описано, трансмембранный домен, который представляет собой или содержит трансмембранную часть CD28 или ее функциональный вариант, и внутриклеточный сигнальный домен, содержащий сигнальную часть 4-1BB или ее функциональный вариант и сигнальную часть CD3-дзета или ее функциональный вариант. В некоторых таких вариантах осуществления рецептор дополнительно включает спейсер, содержащий часть молекулы Ig, такой как молекула Ig человека, такую как шарнир Ig, например, шарнир IgG4, такой как спейсер только из шарнира.

[0501] В некоторых вариантах осуществления трансмембранный домен рекомбинантного рецептора, например CAR, представляет собой или включает трансмембранный домен человеческого CD28 (например, рег. номер P01747.1) или его вариант, такой как трансмембранный домен, включающий последовательность аминокислот, представленную в SEQ ID NO: 8, или последовательность аминокислот, которая демонстрирует по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или большую идентичность последовательности с SEQ ID NO: 8; в некоторых вариантах осуществления трансмембранный домен, содержащий часть рекомбинантного рецептора, включает последовательность аминокислот, представленную в SEQ ID NO: 9, или последовательность аминокислот, обладающую по меньшей мере или приблизительно 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или большей идентичностью последовательности с ней.

[0502] В некоторых вариантах осуществления внутриклеточный сигнальный компонент(ы) рекомбинантного рецептора, например CAR, содержит внутриклеточный костимулирующий сигнальный домен человеческого CD28 или его функциональный вариант или его часть, такой как домен с заменой LL на CC в положениях 186-187 нативного белка CD28. Например, внутриклеточный сигнальный домен может включать последовательность аминокислот, представленную в SEQ ID NO: 10 или 11, или последовательность аминокислот, которая демонстрирует по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или большую идентичность последовательности с SEQ ID NO: 10 или 11. В некоторых вариантах осуществления внутриклеточный домен включает внутриклеточный костимулирующий сигнальный домен 4-1BB (например, рег. номер Q07011.1) или его функциональный вариант или его часть, такую как последовательность аминокислот, представленную в SEQ ID NO: 12, или последовательность аминокислот, которая демонстрирует по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или большую идентичность последовательности с SEQ ID NO: 12.

[0503] В некоторых вариантах осуществления внутриклеточный сигнальный домен

рекомбинантного рецептора, например CAR, включает стимулирующий сигнальный домен CD3-дзета человека или его функциональный вариант, такой как цитоплазматический домен 112 AA изоформы 3 CD3 $\zeta$  человека (рег. номер P20963.2) или сигнальный домен CD3-дзета, как описано в патенте США 7,446,190 или патенте США 8,911,993. Например, в некоторых вариантах осуществления внутриклеточный сигнальный домен включает последовательность аминокислот, представленную в SEQ ID NO: 13, 14 или 15, или последовательность аминокислот, которая демонстрирует по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или большую идентичность последовательности с SEQ ID NO: 13, 14 или 15.

[0504] В некоторых аспектах спейсер содержит только шарнирную область IgG, такую как только шарнир IgG4 или IgG1, такой как спейсер только из шарнира, представленный в SEQ ID NO:1. В других вариантах осуществления спейсер представляет или содержит шарнир Ig, например, полученный из IgG4 шарнир, необязательно связанный с CH2 и/или CH3 доменами. В некоторых вариантах осуществления спейсер является шарниром Ig, например, шарниром IgG4, связанным с CH2 и CH3 доменами, таким как представлено в SEQ ID NO:4. В некоторых вариантах осуществления спейсер является шарниром Ig, например, шарниром IgG4, связанным только с доменом CH3, таким как представлено в SEQ ID NO:3. В некоторых вариантах осуществления спейсер представляет собой или включает богатую глицин-серином последовательность или другой гибкий линкер, такой как известные гибкие линкеры.

[0505] Например, в некоторых вариантах осуществления, CAR включает антитело, такое как фрагмент антитела, включая scFv-фрагменты, спейсер, такой как спейсер, содержащий часть молекулы иммуноглобулина, такую как шарнирная область и/или одна или более константных областей молекулы тяжелой цепи, такой как спейсер, содержащий Ig-шарнир, трансмембранный домен, содержащий весь или часть полученного из CD28 трансмембранного домена, полученный из CD28 внутриклеточный сигнальный домен и сигнальный домен CD3-дзета. В некоторых вариантах осуществления CAR включает антитело или фрагмент, такой как scFv, спейсер, такой как любой спейсер, содержащий Ig-шарнир, полученный из CD28 трансмембранный домен, полученный из 4-1BB внутриклеточный сигнальный домен и полученный из CD3-дзета сигнальный домен.

[0506] Примерные суррогатные маркеры могут включать усеченные формы полипептидов клеточной поверхности, такие как усеченные формы, которые являются нефункциональными и не преобразуют или не способны к преобразованию сигнала или сигнала, обычно преобразовываемого полноразмерной формой полипептида клеточной поверхности, и/или не вызывают или не способны к интернализации. Примерные усеченные полипептиды клеточной поверхности включают усеченные формы факторов роста или других рецепторов, такие как усеченный человеческий рецептор эпидермального фактора роста 2 (tHER2), усеченный рецептор эпидермального фактора роста (tEGFR, примерная последовательность tEGFR представлена в 7 или 16) или простатический специфический мембранный антиген (PSMA) или его модифицированную

форму. tEGFR может содержать эпитоп, распознаваемый антителом цетуксимаб (Эрбитукс®) или другим терапевтическим антителом против EGFR, или связывающей молекулой, которая может использоваться для идентификации или отбора клеток, модифицированных для экспрессии конструкции tEGFR и кодируемого экзогенного белка, и/или элиминирования или отделения клеток, экспрессирующих кодируемый экзогенный белок. См. патент США 8,802,374 и Liu et al., Nature Biotech. 2016 April; 34(4):430-434). В некоторых аспектах маркер, например суррогатный маркер, включает весь или часть (например, усеченную форму) CD34, NGFR, CD19 или усеченный CD19, например, усеченный нечеловеческий CD19 или рецептор эпидермального фактора роста (например, tEGFR). В некоторых вариантах осуществления маркер представляет собой или включает флуоресцентный белок, такой как зеленый флуоресцентный белок (GFP), улучшенный зеленый флуоресцентный белок (EGFP), такой как суперфолдер GFP (sfGFP), красный флуоресцентный белок (RFP), такой как tdTomato, mCherry, mStrawberry, AsRed2, DsRed или DsRed2, голубой флуоресцентный белок (CFP), сине-зеленый флуоресцентный белок (BFP), улучшенный синий флуоресцентный белок (EBFP) и желтый флуоресцентный белок (YFP), и их варианты, включая видовые варианты, мономерные варианты и кодон-оптимизированные и/или улучшенные варианты флуоресцентных белков. В некоторых вариантах осуществления маркер представляет собой или включает фермент, такой как люциферазу, ген lacZ из E. coli, щелочную фосфатазу, секретируемую эмбриональную щелочную фосфатазу (SEAP), хлорамфениколацетилтрансферазу (CAT). Примеры светоиспускающих репортерных генов включают люциферазу (luc),  $\beta$ -галактозидазу, хлорамфениколацетилтрансферазу (CAT),  $\beta$ -глюкуронидазу (GUS) или их варианты.

[0507] В некоторых вариантах осуществления маркер является селективным маркером. В некоторых вариантах осуществления селективный маркер представляет собой или включает полипептид, придающий устойчивость к экзогенным веществам или лекарственным соединениям. В некоторых вариантах осуществления селективный маркер является геном устойчивости к антибиотикам. В некоторых вариантах осуществления селективный маркер является геном устойчивости к антибиотикам, который придает устойчивость к антибиотикам клетке млекопитающего. В некоторых вариантах осуществления селективный маркер представляет собой или включает ген устойчивости к пуромицину, ген устойчивости к гигромицину, ген устойчивости к бластицидину, ген устойчивости к неомицину, ген устойчивости к генетицину или ген устойчивости к зеоцину или их модифицированную форму.

[0508] В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота, кодирующая маркер, функционально связана с полинуклеотидом, кодирующим линкерную последовательность, такую как последовательность расщепляемого линкера, например, T2A. Например, маркер и, необязательно, линкерная последовательность могут быть любыми, как раскрыто в публикации PCT WO2014031687.

[0509] В некоторых вариантах осуществления молекулы нуклеиновых кислот,

кодирующие такие конструкции CAR, дополнительно включают последовательность, кодирующую последовательность элемента пропуска рибосомой из T2A и/или последовательность tEGFR, например, после последовательности, кодирующей CAR. В некоторых вариантах осуществления последовательность кодирует элемент пропуска рибосомой из T2A, представленный в SEQ ID NO: 6 или 17, или последовательность аминокислот, которая демонстрирует по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или большую идентичность последовательности с SEQ ID NO: 6 или 17.

[0510] В некоторых вариантах осуществления также могут быть созданы T-клетки, экспрессирующие антигенный рецептор (например, CAR), с экспрессией усеченного EGFR (EGFRt) в качестве эпитопа для неиммуногенного отбора (например, при введении конструкции, кодирующей CAR и EGFRt, разделенные рибосомным переключателем T2A, для экспрессии двух белков с одной конструкции), который может затем использоваться в качестве маркера для обнаружения таких клеток (см., например, патент США 8,802,374). В некоторых вариантах осуществления последовательность кодирует последовательность tEGFR, представленную в SEQ ID NO: 7 или 16, или последовательность аминокислот, которая демонстрирует по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или большую идентичность последовательности с SEQ ID NO: 7 или 16. В некоторых случаях пептид, такой как T2A, может застывать рибосому пропускать (рибосомный проскок) синтез пептидной связи на С-конце элемента 2A, что приводит к разделению между концом 2A последовательности и следующим пептидом после нее (см., например, de Felipe. *Genetic Vaccines and Ther.* 2:13 (2004) и deFelipe et al. *Traffic* 5:616-626 (2004)). Известно множество 2A элементов. Примеры 2A последовательностей, которые могут использоваться в способах и нуклеиновых кислотах, раскрытых в настоящем документе, включают, без ограничения, 2A последовательности из вируса ящура (F2A, например, SEQ ID NO: 21), вируса ринита лошадей А (E2A, например, SEQ ID NO: 20), вируса *Thosea asigna* (T2A, например, SEQ ID NO: 6 или 17) и тешовируса свиней 1 (P2A, например, SEQ ID NO: 18 или 19), как описано в патентной публикации США 20070116690.

[0511] Рекомбинантные рецепторы, такие как CAR, экспрессируемые клетками, вводимыми субъекту, обычно распознают или специфично связываются с молекулой, которая экспрессируется, ассоциирована и/или является специфической для заболевания или состояния или клеток, подвергаемых лечению. При специфичном связывании с молекулой, например антигеном, рецептор обычно доставляет иммуностимулирующий сигнал, такой как ITAM-преобразуемый сигнал, в клетку, вызывая, таким образом, иммунный ответ, направленный на заболевание или состояние. Например, в некоторых вариантах осуществления клетки экспрессируют CAR, который специфично связывается с антигеном, экспрессируемым клеткой или тканью заболевания или состояния, или ассоциированной с заболеванием или состоянием.

## **В. TCR-рецепторы**

[0512] В некоторых вариантах осуществления предложены модифицированные клетки, такие как Т-клетки, которые экспрессируют Т-клеточный рецептор (TCR) или его антигенсвязывающая часть, которая распознает эпитоп пептида или эпитоп Т-клеток полипептида-мишени, такой как антиген опухоли, вирусный или аутоиммунный белок.

[0513] В некоторых вариантах осуществления "Т-клеточный рецептор" или "TCR" представляет собой молекулу, содержащую переменные  $\alpha$  и  $\beta$ -цепи (также известные как TCR $\alpha$  и TCR $\beta$ , соответственно) или переменные  $\gamma$  и  $\delta$ -цепи (также известные как TCR $\alpha$  и TCR $\beta$ , соответственно), или их антигенсвязывающие части, и которая способна специфично связываться с пептидом, связанным с молекулой МНС. В некоторых вариантах осуществления TCR находится в  $\alpha\beta$  форме. Как правило, TCR-рецепторы, которые существуют в  $\alpha\beta$  и  $\gamma\delta$  формах, в целом являются структурно подобными, но Т-клетки, экспрессирующие их, могут иметь разную анатомическую локализацию или функции. TCR может присутствовать на поверхности клетки или в растворимой форме. Обычно TCR присутствует на поверхности Т-клеток (или Т-лимфоцитов), где он обычно отвечает за распознавание антигенов, связанных с молекулами главного комплекса гистосовместимости (МНС).

[0514] Если не указано иное, следует понимать, что термин "TCR" охватывает полноразмерные TCR-рецепторы, а также его антигенсвязывающие части или антигенсвязывающие фрагменты. В некоторых вариантах осуществления TCR является интактным или полноразмерным TCR, включая TCR-рецепторы в  $\alpha\beta$ -форме или  $\gamma\delta$ -форме. В некоторых вариантах осуществления TCR является антигенсвязывающей частью, которая меньше полноразмерного TCR, но которая связывается с определенным пептидом, связанным на молекуле МНС, то есть связывается с комплексом МНС-пептида. В некоторых случаях антигенсвязывающая часть или фрагмент TCR могут содержать только часть структурных доменов полноразмерного или интактного TCR, но при этом может связывать эпитоп пептида, такой как комплекс МНС-пептида, с которым связывается полный TCR. В некоторых случаях антигенсвязывающая часть содержит переменные домены TCR, такие как переменную  $\alpha$  цепь и переменную  $\beta$  цепь TCR, достаточную для формирования связывающего участка для связывания со специфическим комплексом МНС-пептида. Обычно переменные цепи TCR содержат определяющие комплементарность области, участвующие в распознавании пептида, МНС и/или комплекса МНС-пептида.

[0515] В некоторых вариантах осуществления переменные домены TCR содержат гиперпеременные петли или определяющие комплементарность области (CDR-области), которые обычно вносят основной вклад в способность и специфичность распознавания и связывания антигена. В некоторых вариантах осуществления CDR TCR-рецептора или их комбинация формирует весь или по существу весь антигенсвязывающий сайт данной молекулы TCR. Различные CDR-области в переменной области цепи TCR обычно разделены каркасными областями (FR-областями), которые обычно демонстрируют меньшую переменность среди молекул TCR по сравнению с CDR-областями (см.,

например, Jores et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. U.S.A. 87:9138, 1990; Chothia et al., EMBO J. 7:3745, 1988; также см. Lefranc et al., Dev. Comp. Immunol. 27:55, 2003). В некоторых вариантах осуществления CDR3 является основной CDR-областью, ответственной за связывание или специфичность антигена, или является наиболее важной из трех CDR в данной вариабельной области TCR для распознавания антигена и/или для взаимодействия с процессированной пептидной частью комплекса пептид-МНС. В некоторых контекстах CDR1 альфа-цепи может взаимодействовать с N-концевой частью некоторых антигенных пептидов. В некоторых контекстах CDR1 бета-цепи может взаимодействовать с С-концевой частью пептида. В некоторых контекстах CDR2 вносит наибольший вклад или является основной CDR-областью, ответственной за взаимодействие или распознавание части МНС комплекса МНС-пептид. В некоторых вариантах осуществления вариабельная область  $\beta$ -цепи может содержать дополнительную гипервариабельную область (CDR4 или HVR4), которая обычно участвует в связывании суперантигенов, а не в распознавании антигенов (Kotb (1995) *Clinical Microbiology Reviews*, 8:411-426).

[0516] В некоторых вариантах осуществления TCR также может содержать константный домен, трансмембранный домен и/или короткий цитоплазматический хвост (см., например, Janeway et al., *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease*, 3rd Ed., Current Biology Publications, p. 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 С-конце. В некоторых вариантах осуществления TCR связан с инвариантными белками комплекса CD3, участвующего в опосредовании сигнальной трансдукции.

[0517] В некоторых вариантах осуществления цепь TCR содержит один или более константных доменов. Например, внеклеточная часть данной цепи TCR (например,  $\alpha$ -цепь или  $\beta$ -цепь) может содержать два иммуноглобулиноподобных домена, таких как вариабельный домен (например,  $V\alpha$  или  $V\beta$ ; обычно аминокислоты 1-116 на основе нумерации Кэбата в 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  $\alpha$ -цепи или  $C\alpha$ , как правило, положения 117-259 цепи согласно нумерации Кэбата, или константный домен  $\beta$ -цепи или  $C\beta$ , как правило, положения 117-295 цепи согласно нумерации Кэбата), примыкающий к клеточной мембране. Например, в некоторых случаях внеклеточная часть TCR, образованная двумя цепями, содержит два проксимальных по отношению к мембране константных домена и два дистальных по отношению к мембране вариабельных домена, каждый из которых содержит CDR-области. Константный домен TCR может содержать короткие соединительные последовательности, в которых остаток цистеина образует дисульфидную связь, связывающую, таким образом, две цепи TCR. В некоторых вариантах осуществления TCR может содержать дополнительный остаток цистеина в каждой из  $\alpha$  и  $\beta$ -цепей, в результате TCR содержит две дисульфидные связи в константных доменах.

[0518] В некоторых вариантах осуществления цепи TCR содержат трансмембранный домен. В некоторых вариантах 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 аппарата или комплекса CD3. Внутриклеточные хвосты сигнальных субъединиц CD3 (например, цепи CD3 $\gamma$ , CD3 $\delta$ , CD3 $\epsilon$  и CD3 $\zeta$ ) содержат один или более иммунорецепторных тирозиновых активирующих мотивов или ITAM, которые участвуют в сигнальной способности комплекса TCR.

[0519] В некоторых вариантах осуществления TCR может быть гетеродимером двух цепей  $\alpha$  и  $\beta$  (или необязательно  $\gamma$  и  $\delta$ ), или он может быть одноцепочечной конструкцией TCR. В некоторых вариантах осуществления TCR является гетеродимером, содержащим две отдельные цепи ( $\alpha$  и  $\beta$  цепи или  $\gamma$  и  $\delta$  цепи), которые связаны, например, дисульфидной связью или дисульфидными связями.

[0520] В некоторых вариантах осуществления TCR может быть получен из известной последовательности(ей) TCR, такой как последовательности V $\alpha$ , $\beta$ -цепей, для которых легко доступна по существу полноразмерная кодирующая последовательность. Способы получения полноразмерных последовательностей TCR, включая последовательности V-цепей, из клеточных источников известны. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновые кислоты, кодирующие TCR, могут быть получены из множества источников, например, при амплификации с помощью полимеразной цепной реакции (PCR) TCR-кодирующих нуклеиновых кислот, содержащихся или выделенных из данной клетки или клеток, или путем синтеза общедоступных последовательностей ДНК TCR.

[0521] В некоторых вариантах осуществления TCR получен из биологического источника, например, из клеток, например, из Т-клеток (например, цитотоксических Т-клеток), Т-клеточных гибридом или другого общедоступного источника. В некоторых вариантах осуществления Т-клетки могут быть получены из клеток, выделенных *in vivo*. В некоторых вариантах осуществления TCR представляет собой TCR тимусной селекции. В некоторых вариантах осуществления TCR представляет собой неоэпитоп-рестриктированный TCR. В некоторых вариантах осуществления Т-клетки могут быть культивируемой Т-клеточной гибридомой или клоном. В некоторых вариантах осуществления TCR или его антигенсвязывающая часть или антигенсвязывающий фрагмент могут быть искусственно получены на основе известной последовательности TCR.

[0522] В некоторых вариантах осуществления TCR получен из TCR, идентифицированного или отобранного при скрининге библиотеки кандидатных TCR-рецепторов против полипептидного антигена-мишени или его Т-клеточного эпитопа-

мишени. Библиотеки TCR могут быть получены путем амплификации репертуара V $\alpha$  и V $\beta$  из T-клеток, выделенных у субъекта, включая клетки, присутствующие в МКПК, селезенке или другом лимфоидном органе. В некоторых случаях T-клетки могут быть амплифицированы из инфильтрирующих опухоль лимфоцитов (TIL). В некоторых вариантах осуществления библиотеки TCR могут быть получены из CD4<sup>+</sup> или CD8<sup>+</sup> T-клеток. В некоторых вариантах осуществления TCR могут быть амплифицированы из источника T-клеток у нормального здорового субъекта, то есть из библиотек TCR здоровых доноров. В некоторых вариантах осуществления TCR могут быть амплифицированы из источника T-клеток больного субъекта, то есть из библиотек TCR больных доноров. В некоторых вариантах осуществления для амплификации репертуара генов V $\alpha$  и V $\beta$  используют вырожденные праймеры, например, с помощью ОТ-ПЦР в образцах, таких как T-клетки, полученные у людей. В некоторых вариантах осуществления 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 субъекта и клеток, библиотеки могут быть HLA-аллель-специфическими. В альтернативе, в некоторых вариантах осуществления библиотеки TCR могут быть получены путем мутагенеза или диверсификации родительской или каркасной молекулы TCR. В некоторых аспектах TCR подвергаются направленной эволюции, например, путем мутагенеза, например,  $\alpha$ - или  $\beta$ -цепи. В некоторых аспектах конкретные остатки в CDR-областях TCR изменены. В некоторых вариантах осуществления отобранные TCR могут быть модифицированы путем созревания аффинности. В некоторых вариантах осуществления антигенспецифические T-клетки могут быть отобраны, например, путем скрининга для оценки активности ЦТЛ против пептида. В некоторых аспектах TCR, например, присутствующие на антигенспецифических T-клетках, могут быть отобраны, например, по активности связывания, например, конкретной аффинности или avidности к антигену.

[0523] В некоторых вариантах осуществления TCR или его антигенсвязывающая часть являются такими, которые были модифицированы или сконструированы. В некоторых вариантах осуществления способы направленной эволюции используются для создания TCR с измененными свойствами, например, более высокой аффинностью к конкретному комплексу МНС-пептида. В некоторых вариантах осуществления направленная эволюция достигается методами дисплея, включающими, без ограничения перечисленными, дрожжевой дисплей (Holler et al. (2003) *Nat Immunol*, 4, 55-62; Holler et al. (2000) *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97, 5387-92), фаговый дисплей (Li et al. (2005) *Nat Biotechnol*, 23, 349-54) или T-клеточный дисплей (Chervin et al. (2008) *J. Immunol Methods*, 339, 175-84). В некоторых вариантах осуществления подходы дисплея включают конструирование или модификацию известного, исходного или референсного TCR. Например, в некоторых случаях TCR дикого типа может использоваться в качестве матрицы для получения мутантных TCR, в которых в одном или более остатках CDR-области подвергают мутации и отбирают мутантов с требуемым измененным свойством,



таким как более высокая аффинность к нужному антигену-мишени.

[0524] В некоторых вариантах осуществления пептиды полипептида-мишени для применения при получении или создании представляющего интерес TCR являются известными или могут быть легко идентифицированы. В некоторых вариантах осуществления пептиды, подходящие для применения в создании TCR-рецепторов или антигенсвязывающих частей, могут быть определены по присутствию HLA-рестриктированного мотива в полипептиде-мишени, представляющем интерес, таком как полипептид-мишень, описанный ниже. В некоторых вариантах осуществления пептиды идентифицируют при использовании доступных моделей компьютерного прогнозирования. В некоторых вариантах осуществления для прогнозирования сайтов связывания MHC класса I такие модели включают, без ограничения перечисленными, 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 вариантах осуществления MHC-рестриктированным эпитопом является HLA-A0201, который экспрессируется приблизительно у 39-46% всех представителей европеодной расы и, следовательно, представляет собой подходящий выбор антигена MHC для использования при получении TCR или другой молекулы, связывающей MHC-пептид.

[0525] Известны HLA-A0201-связывающие мотивы и сайты расщепления протеасом и иммунных протеасом при использовании компьютерных моделей прогнозирования. Для прогнозирования сайтов связывания MHC класса I такие модели включают, без ограничения перечисленными, ProPred1 (более подробно описано в публикации Singh and Raghava, ProPred: prediction of HLA-DR binding sites. *BIOINFORMATICS* 17(12):1236-1237 2001) и SYFPEITHI (см. Schuler et al. SYFPEITHI, Database for Searching and T-Cell Epitope Prediction. in *Immunoinformatics Methods in Molecular Biology*, vol 409(1):75-93 2007).

[0526] В некоторых вариантах осуществления TCR или его антигенсвязывающая часть может быть рекомбинантно полученным природным белком или его мутантной формой, в которой было изменено одно или более свойств, таких как характеристики связывания. В некоторых вариантах осуществления TCR может быть получен из одного из различных видов животных, таких как человек, мышь, крыса или другое млекопитающее. TCR может быть связанным с клеткой или может находиться в растворимой форме. В некоторых вариантах осуществления, в рамках предложенных способов, TCR находится в связанной с клеткой форме, экспрессируемой на поверхности клетки.

[0527] В некоторых вариантах осуществления TCR является полноразмерным TCR. В некоторых вариантах осуществления TCR является антигенсвязывающей частью. В некоторых вариантах осуществления TCR является димерным TCR (dTCR). В некоторых вариантах осуществления TCR является одноцепочечным TCR (sc-TCR). В некоторых вариантах осуществления dTCR или scTCR имеют структуры, описанные в WO 03/020763, WO 04/033685, WO2011/044186.

[0528] В некоторых вариантах осуществления TCR содержит последовательность, соответствующую трансмембранной последовательности. В некоторых вариантах осуществления TCR действительно содержит последовательность, соответствующую цитоплазматическим последовательностям. В некоторых вариантах осуществления TCR способен образовывать комплекс TCR с CD3. В некоторых вариантах осуществления любой из TCR-рецепторов, включающих dTCR или scTCR, может быть связан с сигнальными доменами, которые дают активный TCR на поверхности Т-клетки. В некоторых вариантах осуществления TCR экспрессируется на поверхности клеток.

[0529] В некоторых вариантах осуществления dTCR содержит первый полипептид, где последовательность, соответствующая последовательности варибельной области  $\alpha$ -цепи TCR, слита с N-концом последовательности, соответствующей внеклеточной последовательности константной области  $\alpha$ -цепи TCR, и второй полипептид, где последовательность, соответствующая последовательности варибельной области  $\beta$ -цепи TCR, слита с N-концом последовательности, соответствующей внеклеточной последовательности константной области  $\beta$ -цепи TCR, причем первый и второй полипептиды связаны дисульфидной связью. В некоторых вариантах осуществления связь может соответствовать нативной межцепочечной дисульфидной связи, присутствующей в нативных димерных  $\alpha\beta$  TCR-рецепторах. В некоторых вариантах осуществления межцепочечные дисульфидные связи не присутствуют в нативном TCR. Например, в некоторых вариантах осуществления один или более цистеинов могут быть включены во внеклеточные последовательности константной области полипептидной пары dTCR. В некоторых случаях может потребоваться и нативная, и ненативная дисульфидная связь. В некоторых вариантах осуществления TCR содержит трансмембранную последовательность для закрепления в мембране.

[0530] В некоторых вариантах осуществления dTCR содержит  $\alpha$ -цепь TCR, содержащую варибельный  $\alpha$ -домен, константный  $\alpha$ -домен и первый димеризационный мотив, присоединенный к C-концу константного  $\alpha$ -домена, и  $\beta$ -цепь TCR, включающую варибельный  $\beta$ -домен, константный  $\beta$ -домен и первый димеризационный мотив, присоединенный к C-концу константного  $\beta$ -домена, где первый и второй димеризационные мотивы легко взаимодействуют с образованием ковалентной связи между аминокислотой в первом димеризационном мотиве и аминокислотой во втором димеризационном мотиве, связывая  $\alpha$ -цепь TCR и  $\beta$ -цепь TCR друг с другом.

[0531] В некоторых вариантах осуществления TCR представляет собой scTCR. Как правило, scTCR может быть получен с помощью известных способов. См., например, Soo Hoo, W. F. et al. PNAS (USA) 89, 4759 (1992); Wulfiging, C. and Pluckthun, A., J. Mol. Biol. 242, 655 (1994); Kurucz, I. et al. PNAS (USA) 90 3830 (1993); опубликованные международные заявки PCT WO 96/13593, WO 96/18105, WO99/60120, WO99/18129, WO 03/020763, WO2011/044186; и Schlueter, C. J. et al. J. Mol. Biol. 256, 859 (1996). В некоторых вариантах осуществления scTCR содержит введенную ненативную дисульфидную межцепочечную связь, которая способствует ассоциации цепей TCR (см.,

например, опубликованную международную заявку РСТ WO 03/020763). В некоторых вариантах осуществления scTCR представляет собой не связанный дисульфидными цепями усеченный TCR, в котором гетерологичные лейциновые молнии, слитые с его С-концами, облегчают ассоциацию цепей (см., например, опубликованную международную заявку РСТ WO99/60120). В некоторых вариантах осуществления scTCR содержит TCR $\alpha$  переменный домен, ковалентно соединенный с TCR $\beta$  переменным доменом через пептидный линкер (см., например, опубликованную международную заявку РСТ WO99/18129).

[0532] В некоторых вариантах осуществления scTCR содержит первый сегмент, состоящий из аминокислотной последовательности, соответствующей переменной области  $\alpha$ -цепи TCR, второй сегмент, состоящий из аминокислотной последовательности, соответствующей переменной области  $\beta$ -цепи TCR, слитой с N-концом аминокислотной последовательности, соответствующей внеклеточной последовательности константного домена  $\beta$ -цепи TCR, и линкерную последовательность, соединяющую С-конец первого сегмента с N-концом второго сегмента.

[0533] В некоторых вариантах осуществления scTCR содержит первый сегмент, состоящий из последовательности переменной области  $\alpha$ -цепи, слитой с N-концом внеклеточной последовательности константного домена  $\alpha$ -цепи, и второй сегмент, состоящий из последовательности переменной области  $\beta$ -цепи, слитой с N-концом внеклеточной константной последовательности и трансмембранной последовательности  $\beta$ -цепи, и, необязательно, линкерную последовательность, соединяющую С-конец первого сегмента с N-концом второго сегмента.

[0534] В некоторых вариантах осуществления scTCR содержит первый сегмент, состоящий из последовательности переменной области  $\beta$ -цепи TCR, слитой с N-концом внеклеточной последовательности константного домена  $\beta$ -цепи, и второй сегмент, состоящий из последовательности переменной области  $\alpha$ -цепи, слитой с N-концом внеклеточной константной последовательности и трансмембранной последовательности  $\alpha$ -цепи, и, необязательно, линкерную последовательность, соединяющую С-конец первого сегмента с N-концом второго сегмента.

[0535] В некоторых вариантах осуществления линкер scTCR-рецепторов, соединяющий первый и второй сегменты TCR, может быть любым линкером, способным формировать одну полипептидную цепь при сохранении специфичности связывания TCR. В некоторых вариантах осуществления линкерная последовательность может, например, иметь формулу -P-AA-P-, где P представляет собой пролин, и AA представляет собой аминокислотную последовательность, в которой аминокислотами являются глицин и серин. В некоторых вариантах осуществления первый и второй сегменты спарены так, что их последовательности переменной области ориентированы для такого связывания. Следовательно, в некоторых случаях, линкер имеет достаточную длину, чтобы покрывать расстояние между С-концом первого сегмента и N-концом второго сегмента, или наоборот, но не является слишком длинным, чтобы блокировать или уменьшать

связывание scTCR с лигандом-мишенью. В некоторых вариантах осуществления линкер может содержать от 10 до 45 аминокислот или от приблизительно 10 до приблизительно 45 аминокислот, например, 10-30 аминокислот или 26-41 аминокислотных остатков, например, 29, 30, 31 или 32 аминокислоты. В некоторых вариантах осуществления линкер имеет формулу -PGGG-(SGGGG)<sub>5</sub>-, где P представляет собой пролин, G представляет собой глицин, и S представляет собой серин (SEQ ID NO:28). В некоторых вариантах осуществления линкер имеет последовательность GSADDAKKDAAKKDGKS (SEQ ID NO:29)

[0536] В некоторых вариантах осуществления scTCR содержит ковалентную дисульфидную связь, связывающую остаток в иммуноглобулиновой области константного домена α-цепи с остатком в иммуноглобулиновой области константного домена β-цепи. В некоторых вариантах осуществления межцепочечная дисульфидная связь в нативном TCR не присутствует. Например, в некоторых вариантах осуществления один или более цистеинов могут быть включены во внеклеточные последовательности константной области первого и второго сегментов полипептида scTCR. В некоторых случаях может потребоваться и нативная, и ненативная дисульфидная связь.

[0537] В некоторых вариантах осуществления dTCR или scTCR, содержащих введенные межцепочечные дисульфидные связи, нативные дисульфидные связи не присутствуют. В некоторых вариантах осуществления один или более нативных цистеинов, образующих нативные межцепочечные дисульфидные связи, заменены другим остатком, например, серином или аланином. В некоторых вариантах осуществления введенная дисульфидная связь может быть образована в результате мутации нецистеиновых остатков в первом и втором сегментах с заменой на цистеин. Примерные ненативные дисульфидные связи TCR описаны в опубликованной международной заявке PCT WO2006/000830.

[0538] В некоторых вариантах осуществления, TCR или его антигенсвязывающий фрагмент демонстрируют аффинность с равновесной константой связывания с антиген-мишенью от или от приблизительно 10<sup>-5</sup> до 10<sup>-12</sup> M, включая все отдельные значения и диапазоны между ними. В некоторых вариантах осуществления антиген-мишень является комплексом MHC-пептида или лигандом.

[0539] В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота или нуклеиновые кислоты, кодирующие TCR, такие как α и β-цепи, могут быть амплифицированы с помощью ПЦР, клонирования или других подходящих способов и клонированы в подходящий вектор или векторы экспрессии. Вектор экспрессии может быть любым подходящим рекомбинантным вектором экспрессии и может использоваться для трансформации или трансфекции любого подходящего хозяина. Подходящие векторы включают векторы, созданные для размножения и экспансии и/или для экспрессии, такие как плазмиды и вирусы.

[0540] В некоторых вариантах осуществления вектор может быть вектором серии pUC (Fermentas Life Sciences), серии pBluescript (Stratagene, LaJolla, Calif.), серии pET

(Novagen, Madison, Wis.), серии pGEX (Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden), или серии pEX (Clontech, Palo Alto, Calif.). В некоторых случаях также могут использоваться векторы на основе бактериофага, такие как  $\lambda$ G10,  $\lambda$ GT11,  $\lambda$ ZapII (Stratagene),  $\lambda$ EMBL4 и  $\lambda$ NM1149. В некоторых вариантах осуществления могут использоваться векторы для экспрессии в растениях, включающие pBI01, pBI101.2, pBI101.3, pBI121 и pBIN19 (Clontech). В некоторых вариантах осуществления векторы экспрессии в животных включают pEUK-C1, pMAM и pMAMneo (Clontech). В некоторых вариантах осуществления используется вирусный вектор, такой как ретровирусный вектор.

[0541] В некоторых вариантах осуществления рекомбинантные векторы экспрессии могут быть получены при использовании стандартных технологий рекомбинантных ДНК. В некоторых вариантах осуществления векторы могут содержать регуляторные последовательности, такие как кодоны инициации и терминации транскрипции и трансляции, которые являются специфическими для типа организма-хозяина (например, бактерии, гриба, растения или животного), в который требуется ввести вектор, в соответствии с требованиями и с учетом того, является ли вектор вектором на основе ДНК или РНК. В некоторых вариантах осуществления вектор может содержать ненативный промотор, функционально связанный с нуклеотидной последовательностью, кодирующей TCR или его антигенсвязывающую часть (или другую молекулу, связывающую МНС-пептид). В некоторых вариантах осуществления промотор может быть невирусным промотором или вирусным промотором, таким как цитомегаловирусный (ЦМВ) промотор, промотор SV40, промотор RSV и промотор, обнаруженный в длинном концевом повторе вирус стволовых клеток мышей. Также предусмотрены другие известные промоторы.

[0542] В некоторых вариантах осуществления для получения вектора, кодирующего TCR,  $\alpha$  и  $\beta$ -цепи амплифицируют с помощью ПЦР из суммарной кДНК, выделенной из клона Т-клеток, экспрессирующего представляющий интерес TCR, и клонируют в вектор экспрессии. В некоторых вариантах осуществления  $\alpha$  и  $\beta$ -цепи клонируют в один вектор. В некоторых вариантах осуществления  $\alpha$  и  $\beta$ -цепи клонируются в разные векторы. В некоторых вариантах осуществления полученные  $\alpha$  и  $\beta$ -цепи включают в ретровирусный, например лентивирусный, вектор.

### III. СПОСОБЫ ВВЕДЕНИЯ

[0543] В некоторых вариантах осуществления готовые композиции обогащенных Т-клеток, такие как разделенные композиции CD4<sup>+</sup> и CD8 готовые композиции, полученные предложенными способами, такими как представленные в Разделе I, вводят в качестве клеточной терапии, например, адоптивной клеточной терапии. В конкретных вариантах осуществления одну или более композиций клеток, например, готовые композиции клеток, описанные в настоящем документе, вводят в качестве клеточной терапии. В некоторых вариантах осуществления способы адоптивной Т-клеточной терапии описаны, например, в публикации заявки на патент США 2003/0170238 (Gruenberg et al.); патенте США 4,690,915 (Rosenberg); Rosenberg (2011) Nat Rev Clin Oncol. 8(10):577-85). См., например, Themeli et al. (2013) Nat Biotechnol. 31(10):928-933;

Tsukahara et al. (2013) *Biochem Biophys Res Commun* 438(1):84-9; Davila et al. (2013) *PLoS ONE* 8(4):e61338.

[0544] В некоторых вариантах осуществления в способах, предложенных в настоящем документе, получают одну готовую композицию обогащенных Т-клеток из исходных клеток, выделенных, отобранных и/или обогащенных из одного биологического образца, который вводят в качестве клеточной терапии. В конкретных вариантах осуществления одна готовая композиция является композицией обогащенных CD4+ Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления одна готовая композиция является композицией обогащенных CD4+ и CD8+ Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления в способах, предложенных в настоящем документе, получают две или более готовых композиций из одного источника, например, биологического образца и/или исходных композиций, выделенных, отобранных или обогащенных из биологического образца, которые вводят субъекту. В некоторых вариантах осуществления две или более готовых композиции вводят субъекту отдельно. В некоторых вариантах осуществления две или более готовых композиций объединяют в одну композицию и вводят субъекту. В некоторых вариантах осуществления две или более готовых композиций включают готовую композицию обогащенных CD4+ Т-клеток и готовую композицию обогащенных CD8+ Т-клеток.

[0545] В некоторых вариантах осуществления готовая композиция обогащенных CD4+ Т-клеток, которую вводят субъекту, включает по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99%, по меньшей мере 99,5%, по меньшей мере 99,9% или 100% или приблизительно 100% CD4+ Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления готовая композиция включает по меньшей мере 30%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99%, по меньшей мере 99,5%, по меньшей мере 99,9% или 100% или приблизительно 100% CD4+ Т-клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор и/или трансдуцированных или трансфицированных рекомбинантным полинуклеотидом. В некоторых вариантах осуществления готовая композиция обогащенных CD4+ Т-клеток, которую вводят субъекту, включает меньше 40%, меньше 35%, меньше 30%, меньше 25%, меньше 20%, меньше 15%, меньше 10%, меньше 5%, меньше 1%, меньше 0,1% или меньше 0,01% CD8+ Т-клеток, и/или не содержит CD8+ Т-клетки, и/или не содержит или по существу не содержит CD8+ Т-клетки.

[0546] В некоторых вариантах осуществления готовая композиция обогащенных CD8+ Т-клеток, которую вводят субъекту, включает по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99%, по меньшей мере 99,5%, по меньшей мере 99,9% или 100% или

приблизительно 100% CD8+ Т-клеток. В конкретных вариантах осуществления композиция включает по меньшей мере 30%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99%, по меньшей мере 99,5%, по меньшей мере 99,9% или 100% или приблизительно 100% CD8+ Т-клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор и/или трансдуцированных или трансфицированных рекомбинантным полинуклеотидом. В некоторых вариантах осуществления готовая композиция обогащенных CD8+ Т-клеток, которую вводят субъекту, включает меньше 40%, меньше 35%, меньше 30%, меньше 25%, меньше 20%, меньше 15%, меньше 10%, меньше 5%, меньше 1%, меньше 0,1% или меньше 0,01% CD4+ Т-клеток, и/или не содержит CD4+ Т-клетки, и/или не содержит или по существу не содержит CD4+ Т-клетки.

[0547] Заболевание или состояние, которое лечат, может быть любым, при котором экспрессия антигена ассоциирована и/или участвует в этиологии заболевания или нарушения, например, вызывает, усугубляет или иным образом участвует в таком заболевании, состоянии или нарушении. Типичные заболевания и состояния могут включать заболевания или состояния, ассоциированные со злокачественным новообразованием или перерождением клеток (например, раком), аутоиммунным или воспалительным заболеванием или инфекционным заболеванием, например, вызванным бактериальным, вирусным или другим патогеном. Типичные антигены, которые включают антигены, ассоциированные с различными заболеваниями и состояниями, которые можно лечить, описаны выше. В конкретных вариантах осуществления химерный антигенный рецептор или трансгенный TCR специфично связывается с антигеном, ассоциированным с заболеванием или состоянием.

[0548] Заболевания, состояния и нарушения включают опухоли, в том числе солидные опухоли, гемобластные злокачественные новообразования и меланомы, а также локализованные и метастатические опухоли, инфекционные заболевания, такие как инфекции, вызванные вирусом или другим патогеном, например ВИЧ, ВГС, ВГВ, ЦМВ, ВПЧ, и паразитарные заболевания, аутоиммунные и воспалительные заболевания. В некоторых вариантах осуществления заболевание, нарушение или состояние представляет собой опухоль, рак, злокачественное новообразование, неоплазию или другое пролиферативное заболевание или нарушение. Такие заболевания включают, без ограничения перечисленными, лейкоз, лимфому, например, острый миелоидный (или миелогенный) лейкоз (ОМЛ), хронический миелоидный (или миелогенный) лейкоз (ХМЛ), острый лимфоцитарный (или лимфобластный) лейкоз (ОЛЛ), хронический лимфоцитарный лейкоз (ХЛЛ), волосатоклеточный лейкоз (НСЛ), мелкоклеточную лимфоцитарную лимфому (SLL), лимфому из мантийных клеток (MCL), лимфому из клеток маргинальной зоны, лимфому Беркитта, лимфому Ходжкина (ХЛ), неходжкинскую лимфому (НХЛ), анапластическую крупноклеточную лимфому (АККЛ), фолликулярную лимфому, рефрактерную фолликулярную лимфому, диффузную В-крупноклеточную

лимфому (ДВККЛ) и множественную миелому (ММ). В некоторых вариантах осуществления заболевание или состояние является В-клеточным злокачественным новообразованием, выбранным из острого лимфобластного лейкоза (ОЛЛ), ОЛЛ взрослых, хронического лимфобластного лейкоза (ХЛЛ), неходжкинской лимфомы (НХЛ) и диффузной В-крупноклеточной лимфомы (ДВККЛ). В некоторых вариантах осуществления заболевание или состояние представляет собой НХЛ, при этом НХЛ выбрана из группы, состоящей из агрессивной формы НХЛ, диффузной В-крупноклеточной лимфомы (ДВККЛ), БДУ (de novo и трансформировавшаяся из индолентной), первичной медиастинальной В-крупноклеточной лимфомы (ПМВККЛ), богатой Т-клетками/гистиоцитами В-крупноклеточной лимфомы (ТСНРВСЛ), лимфомы Беркитта, лимфомы из мантийных клеток (МСЛ) и/или фолликулярной лимфомы (FL), необязательно, фолликулярной лимфомы степени 3В (FL3В).

[0549] В некоторых вариантах осуществления заболевание или состояние является инфекционным заболеванием или состоянием, таким как, без ограничения перечисленными, вирусные, ретровирусные, бактериальные и протозойные инфекции, иммунодефицит, цитомегаловирус (ЦМВ), вирус Эпштейна-Барр (ВЭБ), аденовирус, ВК полиомавирус. В некоторых вариантах осуществления заболевание или состояние представляет собой аутоиммунное или воспалительное заболевание или состояние, такое как артрит, например, ревматоидный артрит (РА), диабет I типа, системную красную волчанку (СКВ), воспалительное заболевание кишечника, псориаз, склеродермию, аутоиммунное заболевание щитовидной железы, болезнь Грейвса, болезнь Крона, рассеянный склероз, астму и/или заболевание или состояние, связанное с трансплантатом.

[0550] В некоторых вариантах осуществления антиген, ассоциированный с заболеванием или нарушением, выбран из  $\alpha\upsilon\beta6$  интегрина (интегрина  $\alpha\upsilon\beta6$ ), антигена созревания В-клеток (BCMA), В7-Н3, В7-Н6, карбоангидразы 9 (CA9, также известной как CAIX или G250), раково-тестикулярного антигена, ракового/тестикулярного антигена 1В (СТАГ, также известного как NY-ESO-1 и LAGE-2), раково-эмбрионального антигена (РЭА), циклина, циклина А2, хемокинового лиганда с С-С-мотивом 1 (CCL-1), CD19, CD20, CD22, CD23, CD24, CD30, CD33, CD38, CD44, CD44v6, CD44v7/8, CD123, CD138, CD171, белка эпидермального фактора роста (EGFR), усеченного белка эпидермального фактора роста (tEGFR), мутантного рецептора эпидермального фактора роста III типа (EGFR vIII), эпителиального гликопротеина 2 (EPG-2), эпителиального гликопротеина 40 (EPG-40), эфрина В2, рецептора эфрина А2 (EPHa2), эстрогенового рецептора, Fc-рецептор-подобного белка 5 (FCRL5; также известного как гомолог Fc-рецептора 5 или FCRH5), эмбрионального рецептора ацетилхолина (фетального AchR), фолатсвязывающего белка (FBP), альфа-рецептора фолата, эмбрионального рецептора ацетилхолина, ганглиозид GD2, О-ацетилированного GD2 (OGD2), ганглиозида GD3, гликопротеина 100 (gp100), G-белок-сопряженного рецептора 5D (GPRC5D), Her2/neu (рецепторной тирозинкиназы erb-B2), Her3 (erb-B3), Her4 (erb-B4), димеров erbB, человеческого высокомолекулярного меланома-ассоциированного антигена (HMW-MAA),



поверхностного антигена гепатита В, человеческого лейкоцитарного антигена А1 (HLA-A1), человеческого лейкоцитарного антигена А2 (HLA-A2), альфа-рецептора IL-22 (IL-22R $\alpha$ ), альфа-рецептора IL-13 2 (IL-13R $\alpha$ 2), рецептора с доменом вставки киназы (kdr), легкой цепи каппа, молекулы клеточной адгезии L1 (L1CAM), CE7 эпитопа L1-CAM, члена А семейства содержащих богатые лейцином повторы белков 8 (LRRC8A), Льюис Y, меланома-ассоциированного антигена (MAGE)-A1, MAGE-A3, MAGE-A6, мезотелина, с-Met, цитомегаловируса мышей (CMV), муцина 1 (MUC1), MUC16, лигандов члена D группы 2 рецепторов NK-клеток (NKG2D), мелана А (MART-1), невральная молекулы клеточной адгезии (NCAM), онкофетального антигена, предпочтительно экспрессируемого антигена меланомы (PRAME), рецептора прогестерона, простатического специфического антигена, простатического антигена стволовых клеток (PSCA), простатического специфического мембранного антигена (PSMA), подобного рецепторной тирозинкиназе орфанного рецептора 1 (ROR1), сурвивина, трофобластического гликопротеина (TPBG, также известного как 5T4), опухолеассоциированного гликопротеина 72 (TAG72), рецептора фактора роста эндотелия сосудов (VEGFR), рецептора фактора роста эндотелия сосудов 2 (VEGFR2), белка опухоли Вильмса 1 (WT-1), патоген-специфического антигена или антигена, ассоциированного с универсальной меткой, и/или биотинилированных молекул и/или молекул, экспрессируемых ВИЧ, ВГС, ВГВ или другими патогенами. Антигены, являющиеся мишенью рецепторов, в некоторых вариантах осуществления включают антигены, ассоциированные с В-клеточным злокачественным новообразованием, таким как любые из известных В-клеточных маркеров. В некоторых вариантах осуществления антиген, являющийся мишенью рецептора, включает CD20, CD19, CD22, ROR1, CD45, CD21, CD5, CD33, Ig-каппа, Ig-лямбда, CD79a, CD79b или CD30. В некоторых вариантах осуществления антиген является патогенспецифическим антигеном. В некоторых вариантах осуществления антиген является вирусным антигеном (таким как вирусный антиген из ВИЧ, ВГС, ВГВ и т.д.), бактериальными антигенами и/или паразитарными антигенами.

[0551] В некоторых вариантах осуществления заболевание или состояние является В-клеточным злокачественным новообразованием. В некоторых вариантах осуществления В-клеточное злокачественное новообразование является лейкозом или лимфомой. В некоторых аспектах заболевание или состояние является острым лимфобластным лейкозом (ОЛЛ), ОЛЛ взрослых, хроническим лимфобластным лейкозом (ХЛЛ), неходжкинской лимфомой (НХЛ) и диффузной В-крупноклеточной лимфомой (ДВККЛ). В некоторых случаях заболевание или состояние представляет собой НХЛ, такую как или включающую НХЛ, которая является агрессивной формой НХЛ, диффузной В-крупноклеточной лимфомой (ДВККЛ), БДУ (de novo и трансформировавшейся из индолентной), первичной медиастинальной В-крупноклеточной лимфомой (ПМВККЛ), богатой Т-клетками/гистиоцитами В-крупноклеточной лимфомой (ТСНРВСЛ), лимфомой Беркитта, лимфомой из мантийных клеток (MCL) и/или фолликулярной лимфомой (FL),

необязательно, фолликулярной лимфомы степени 3В (FL3В). В некоторых аспектах рекомбинантный рецептор, такой как CAR, специфично связывается с антигеном, ассоциированным с заболеванием или состоянием, или экспрессируется в клетках окружения очага, ассоциированного с В-клеточным злокачественным новообразованием. Антигены, являющиеся мишенями рецепторов, в некоторых вариантах осуществления включают антигены, ассоциированные с В-клеточным злокачественным новообразованием, такие как любые из различных известных В-клеточных маркеров. В некоторых вариантах осуществления антиген, являющийся мишенью рецептора, представляет собой CD20, CD19, CD22, ROR1, CD45, CD21, CD5, CD33, Ig-каппа, Ig-лямбда, CD79a, CD79b или CD30 или их комбинации.

[0552] В некоторых вариантах осуществления заболевание или состояние является миеломой, такой как множественная миелома. В некоторых аспектах рекомбинантный рецептор, такой как CAR, специфично связывается с антигеном, ассоциированным с заболеванием или состоянием, или экспрессирующимся в клетках окружения очага, ассоциированного с множественной миеломой. Антигены, являющиеся мишенями рецепторов, в некоторых вариантах осуществления включают антигены, ассоциированные с множественной миеломой. В некоторых аспектах антиген, например второй или дополнительный антиген, такой как специфичный для заболевания антиген и/или родственный ему антиген, экспрессируется на множественной миеломе, такой как антиген созревания В-клеток (BCMA), член D группы 5 класса C G-белок-сопряженных рецепторов (GPCR5D), CD38 (гидролаза циклической АДФ-рибозы), CD138 (синдекан-1, синдекан, SYN-1), CS-1 (CS1, CD2 подгруппы 1, CRACC, SLAMF7, CD319 и 19A24), BAFF-R, TACI и/или FcRH5. Другие примерные антигены множественной миеломы включают CD56, TIM-3, CD33, CD123, CD44, CD20, CD40, CD74, CD200, EGFR,  $\beta$ 2-микроглобулин, HM1.24, IGF-1R, IL-6R, TRAIL-R1 и рецептор активина типа IIA (ActRIIA). См. Benson and Byrd, *J. Clin. Oncol.* (2012) 30(16): 2013-15; Tao and Anderson, *Bone Marrow Research* (2011):924058; Chu et al., *Leukemia* (2013) 28(4):917-27; Garfall et al., *Discov Med.* (2014) 17(91):37-46. В некоторых вариантах осуществления антигены включают антигены, присутствующие в лимфоидных опухолях, миеломе, СПИД-ассоциированной лимфоме и/или послетрансплантационных лимфопролиферациях, такие как CD38. Антитела или антигенсвязывающие фрагменты, направленные против таких антигенов, известны и включают, например, описанные в патенте США 8,153,765; 8,603,477, 8,008,450; публикациях US20120189622 или US20100260748; и/или международных публикациях PCT WO2006099875, WO2009080829 или WO2012092612, или WO2014210064. В некоторых вариантах осуществления такие антитела или их антигенсвязывающие фрагменты (например, scFv) содержатся в мультиспецифичных антителах, мультиспецифичных химерных рецепторах, таких как мультиспецифичные CAR-рецепторы, и/или мультиспецифичных клетках.

[0553] В некоторых вариантах осуществления антиген является патоген-специфическим или патоген-экспрессируемым антигеном. В некоторых вариантах

осуществления антиген является вирусным антигеном (таким как вирусный антиген из ВИЧ, ВГС, ВГВ и т.д.), бактериальными антигенами и/или паразитарными антигенами.

[0554] В некоторых вариантах осуществления клеточную терапию, например, адоптивную Т-клеточную терапию, осуществляют путем аутологичного переноса, при котором клетки выделяют и/или иным образом получают у субъекта, который должен получить клеточную терапию, или из образца, полученного у такого субъекта. Таким образом, в некоторых аспектах клетки получают у субъекта, например пациента, нуждающегося в лечении, и клетки после выделения и обработки вводят тому же субъекту.

[0555] В некоторых вариантах осуществления клеточную терапию, например, адоптивную Т-клеточную терапию, осуществляют путем аллогенного переноса, при котором клетки выделяют и/или иным образом получают у субъекта, отличающегося от субъекта, который должен получить или который, в конечном счете, получает клеточную терапию, например, первого субъекта. В таких вариантах осуществления клетки затем вводят другому субъекту, например второму субъекту того же биологического вида. В некоторых вариантах осуществления первый и второй субъекты являются генетически идентичными. В некоторых вариантах осуществления первый и второй субъекты являются генетически подобными. В некоторых вариантах осуществления второй субъект экспрессирует такой же класс или супертип HLA, что и первый субъект.

[0556] Клетки, например модифицированные клетки, полученные способом, предложенным в настоящем документе, таким как описано в Разделе I, могут вводить любыми подходящими способами. В конкретных вариантах осуществления клетки из двух или более отдельных готовых композиций, например, композиций обогащенных Т-клеток, полученных способами, предложенными в настоящем документе, таким как описано в Разделе I, объединяют в одну композицию клеток, которую надлежит вводить. В некоторых вариантах осуществления клетки из отдельных готовых композиций вводят субъекту отдельно. В некоторых вариантах осуществления CD4+ Т-клетки вводят отдельно от CD8+ Т-клеток.

[0557] В некоторых вариантах осуществления клетки могут вводить путем болюсной инфузии, инъекции, например, внутривенной или подкожной инъекций, внутриглазной инъекции, периокулярной инъекции, субретинальной инъекции, интравитреальной инъекции, транс-септальной инъекции, субскеральной инъекции, внутрехориоидальной инъекции, внутрикамеральной инъекции, субконъюнктивальной инъекции, субтеноновой инъекции, ретробульбарной инъекции, перibuльбарной инъекции или задней окологскеральной доставки. В некоторых вариантах осуществления их вводят парентерально, внутрилегочно и интраназально, и, при необходимости, для местного лечения, внутриочагового введения. Парентеральные инфузии включают внутримышечное, внутривенное, внутриартериальное, внутрибрюшинное или подкожное введение. В некоторых вариантах осуществления данную дозу вводят путем однократного болюсного введения клеток. В некоторых вариантах осуществления ее вводят путем

многократного болюсного введения клеток, например, в течение периода не более 3 дней или путем непрерывного инфузионного введения клеток. В некоторых вариантах осуществления введение дозы клеток или любых дополнительных терапий, например, лимфодеплеционной терапии, интервенционной терапии и/или комбинированной терапии, осуществляют посредством амбулаторной доставки.

[0558] Для профилактики или лечения заболевания, подходящая доза может зависеть от типа заболевания, подлежащего лечению, типа клеток или рекомбинантных рецепторов, тяжести и течения заболевания, от введения клеток в профилактических или терапевтических целях, предыдущей терапии, истории заболевания субъекта и ответа на клетки, а также от решения лечащего врача. Композиции и клетки в некоторых вариантах осуществления соответствующим образом вводят субъекту однократно или в серии процедур.

[0559] В некоторых вариантах осуществления клетки вводят в качестве части комбинированного лечения, например, одновременно или последовательно, в любом порядке, с другим терапевтическим вмешательством, таким как антитело или модифицированная клетка, или рецептор, или средство, такое как цитотоксическое или терапевтическое средство. Клетки в некоторых вариантах осуществления вводят совместно с одним или более дополнительными терапевтическими средствами или в сочетании с другим терапевтическим вмешательством, одновременно или последовательно, в любом порядке. В некоторых контекстах клетки вводят совместно с другой терапией, достаточно близко по времени, таким образом, что популяции клеток усиливают действие одного или более дополнительных терапевтических средств, или наоборот. В некоторых вариантах осуществления клетки вводят до одного или более дополнительных терапевтических средств. В некоторых вариантах осуществления клетки вводят после одного или более дополнительных терапевтических средств. В некоторых вариантах осуществления одно или более дополнительных средств включают цитокин, такой как IL-2, например, для улучшения персистенции. В некоторых вариантах осуществления способы включают введение химиотерапевтического средства.

[0560] В некоторых вариантах осуществления способы включают введение химиотерапевтического средства, например, кондиционирующего химиотерапевтического средства, например, для уменьшения опухолевой нагрузки перед введением.

[0561] Прекондиционирование субъектов с применением иммунодеплеционных (например, лимфодеплеционных) терапий в некоторых аспектах может улучшить эффекты адоптивной клеточной терапии (АСТ).

[0562] Таким образом, в некоторых вариантах осуществления способы включают введение прекодиционирующего средства, такого как лимфодеплеционное или химиотерапевтическое средство, такое как циклофосфамид, флударабин или их комбинации, субъекту до начала клеточной терапии. Например, субъекту могут вводить прекодиционирующее средство по меньшей мере за 2 дня, например, по меньшей мере за 3, 4, 5, 6 или 7 дней, до начала клеточной терапии. В некоторых вариантах осуществления

субъекту вводят прекондиционирующее средство не больше чем за 7 дней, например, не больше чем за 6, 5, 4, 3 или 2 дня, до начала клеточной терапии.

[0563] В некоторых вариантах осуществления субъекта прекондиционируют циклофосфамидом в дозе от или от приблизительно 20 мг/кг до 100 мг/кг, такой как от или от приблизительно 40 мг/кг до 80 мг/кг. В некоторых аспектах субъекта прекондиционируют 60 мг/кг или приблизительно 60 мг/кг циклофосфамида. В некоторых вариантах осуществления циклофосфамид могут вводить в однократной дозе или могут вводить во множестве доз, например, вводимых ежедневно, раз в два дня или раз в три дня. В некоторых вариантах осуществления циклофосфамид вводят один раз в день в течение одного или двух дней. В некоторых вариантах осуществления, когда лимфодеплеционное средство включает циклофосфамид, субъекту вводят циклофосфамид в дозе от или от приблизительно 100 мг/м<sup>2</sup> до 500 мг/м<sup>2</sup>, такой как от или от приблизительно 200 мг/м<sup>2</sup> до 400 мг/м<sup>2</sup> или от 250 мг/м<sup>2</sup> до 350 мг/м<sup>2</sup>, включительно. В некоторых случаях субъекту вводят приблизительно 300 мг/м<sup>2</sup> циклофосфамида. В некоторых вариантах осуществления циклофосфамид могут вводить в однократной дозе или могут вводить во множестве доз, например, вводимых ежедневно, раз в два дня или раз в три дня. В некоторых вариантах осуществления циклофосфамид вводят ежедневно, например, в течение 1-5 дней, например, в течение 3-5 дней. В некоторых случаях субъекту вводят приблизительно 300 мг/м<sup>2</sup> циклофосфамида, ежедневно в течение 3 дней, до начала клеточной терапии.

[0564] В некоторых вариантах осуществления, когда лимфодеплеционное средство включает флударабин, субъекту вводят флударабин в дозе от или от приблизительно 1 мг/м<sup>2</sup> до 100 мг/м<sup>2</sup>, такой как от или от приблизительно 10 мг/м<sup>2</sup> до 75 мг/м<sup>2</sup>, от 15 мг/м<sup>2</sup> до 50 мг/м<sup>2</sup>, от 20 мг/м<sup>2</sup> до 40 мг/м<sup>2</sup> или от 24 мг/м<sup>2</sup> до 35 мг/м<sup>2</sup>, включительно. В некоторых случаях субъекту вводят приблизительно 30 мг/м<sup>2</sup> флударабина. В некоторых вариантах осуществления флударабин могут вводить в однократной дозе или могут вводить во множестве доз, например, вводимых ежедневно, раз в два дня или раз в три дня. В некоторых вариантах осуществления флударабин вводят ежедневно, например, в течение 1-5 дней, например, в течение 3-5 дней. В некоторых случаях субъекту вводят приблизительно 30 мг/м<sup>2</sup> флударабина, ежедневно в течение 3 дней, до начала клеточной терапии.

[0565] В некоторых вариантах осуществления лимфодеплеционное средство включает комбинацию средств, такую как комбинацию циклофосфамида и флударабина. Таким образом, комбинация средств может включать циклофосфамид в любой дозе или схеме применения, таких как описанные выше, и флударабин в любой дозе или схеме применения, таких как описанные выше. Например, в некоторых аспектах субъекту вводят 60 мг/кг (~2 г/м<sup>2</sup>) циклофосфамида и 3-5 доз 25 мг/м<sup>2</sup> флударабина перед введением первой или последующей дозы.

[0566] После введения клеток биологическую активность модифицированной популяции клеток в некоторых вариантах осуществления измеряют, например, с помощью

любого из множества известных методов. Параметры для оценки включают специфичное связывание модифицированных или природных Т-клеток или другой иммунной клетки с антигеном, *in vivo*, например, с помощью визуализации, или *ex vivo*, например, с помощью проточной цитометрии или ИФА. В некоторых вариантах осуществления способность модифицированных клеток разрушать клетки-мишени может быть измерена с помощью любых подходящих известных методов, таких как пробы на цитотоксичность, описанные, например, в публикациях Kochenderfer et al., *J. Immunotherapy*, 32(7):689-702 (2009), и Herman et al. *J. Immunological Methods*, 285(1):25-40 (2004). В некоторых вариантах осуществления биологическую активность клеток измеряют путем анализа экспрессии и/или секреции одного или более цитокинов, таких как CD107a, IFN $\gamma$ , IL-2 и ФНО. В некоторых аспектах биологическую активность измеряют путем оценки клинического результата, такого как снижение опухолевой массы или нагрузки.

[0567] В некоторых вариантах осуществления модифицированные клетки дополнительно модифицируют любым количеством способов, в результате чего их терапевтическая или профилактическая эффективность повышается. Например, модифицированный CAR или TCR, экспрессируемый популяцией, может быть конъюгирован напрямую или непрямою через линкер с направляющим фрагментом. Практика конъюгирования соединений, например, CAR или TCR, с направляющими фрагментами известна. См., например, Wadwa et al., *J. Drug Targeting* 3: 1 1 1 (1995) и патент США 5,087,616.

[0568] В некоторых вариантах осуществления дозу клеток вводят субъектам в соответствии с предложенными способами и/или с предложенными изделиями или композициями. В некоторых вариантах осуществления величина или график введения доз определяются в зависимости от конкретного заболевания или состояния у субъекта. В некоторых случаях величина или график введения доз при конкретном заболевании могут быть определены эмпирически с учетом представленного описания.

[0569] В некоторых вариантах осуществления доза клеток включает от или от приблизительно  $2 \times 10^5$  клеток/кг до или до приблизительно  $2 \times 10^6$  клеток/кг, например, от или от приблизительно  $4 \times 10^5$  клеток/кг до или до приблизительно  $1 \times 10^6$  клеток/кг или от или от приблизительно  $6 \times 10^5$  клеток/кг до или до приблизительно  $8 \times 10^5$  клеток/кг. В некоторых вариантах осуществления доза клеток включает не больше  $2 \times 10^5$  клеток (например, антиген-экспрессирующих, таких как CAR-экспрессирующие клетки) на килограмм массы тела субъекта (клеток/кг), например, не больше чем или приблизительно  $3 \times 10^5$  клеток/кг, не больше чем или приблизительно  $4 \times 10^5$  клеток/кг, не больше чем или приблизительно  $5 \times 10^5$  клеток/кг, не больше чем или приблизительно  $6 \times 10^5$  клеток/кг, не больше чем или приблизительно  $7 \times 10^5$  клеток/кг, не больше чем или приблизительно  $8 \times 10^5$  клеток/кг, не больше чем или приблизительно  $9 \times 10^5$  клеток/кг, не больше чем или приблизительно  $1 \times 10^6$  клеток/кг или не больше чем или приблизительно  $2 \times 10^6$  клеток/кг. В некоторых вариантах осуществления доза клеток включает по меньшей мере или по меньшей мере приблизительно или приблизительно  $2 \times 10^5$  клеток (например, антиген-

экспрессирующих, таких как CAR-экспрессирующие клетки) на килограмм массы тела субъекта (клеток/кг), например, по меньшей мере или по меньшей мере приблизительно или приблизительно  $3 \times 10^5$  клеток/кг, по меньшей мере или по меньшей мере приблизительно или приблизительно  $4 \times 10^5$  клеток/кг, по меньшей мере или по меньшей мере приблизительно или приблизительно  $5 \times 10^5$  клеток/кг, по меньшей мере или по меньшей мере приблизительно или приблизительно  $6 \times 10^5$  клеток/кг, по меньшей мере или по меньшей мере приблизительно или приблизительно  $7 \times 10^5$  клеток/кг, по меньшей мере или по меньшей мере приблизительно или приблизительно  $8 \times 10^5$  клеток/кг, по меньшей мере или по меньшей мере приблизительно или приблизительно  $9 \times 10^5$  клеток/кг, по меньшей мере или по меньшей мере приблизительно или приблизительно  $1 \times 10^6$  клеток/кг, или по меньшей мере или по меньшей мере приблизительно или приблизительно  $2 \times 10^6$  клеток/кг.

[0570] В некоторых вариантах осуществления клетки или отдельные популяции подтипов клеток вводят субъекту в пределах от приблизительно одного миллиона до приблизительно 100 миллиардов клеток и/или такое количество клеток на килограмм массы тела, такое как, например, от 1 миллиона до приблизительно 50 миллиардов клеток (например, приблизительно 5 миллионов клеток, приблизительно 25 миллионов клеток, приблизительно 500 миллионов клеток, приблизительно 1 миллиард клеток, приблизительно 5 миллиардов клеток, приблизительно 20 миллиардов клеток, приблизительно 30 миллиардов клеток, приблизительно 40 миллиардов клеток, или в пределах, определенных любыми двумя из предыдущих значений), например, от приблизительно 10 миллионов до приблизительно 100 миллиардов клеток (например, приблизительно 20 миллионов клеток, приблизительно 30 миллионов клеток, приблизительно 40 миллионов клеток, приблизительно 60 миллионов клеток, приблизительно 70 миллионов клеток, приблизительно 80 миллионов клеток, приблизительно 90 миллионов клеток, приблизительно 10 миллиардов клеток, приблизительно 25 миллиардов клеток, приблизительно 50 миллиардов клеток, приблизительно 75 миллиардов клеток, приблизительно 90 миллиардов клеток, или в пределах, определенных любыми двумя из предыдущих значений), и, в некоторых случаях, от приблизительно 100 миллионов клеток до приблизительно 50 миллиардов клеток (например, приблизительно 120 миллионов клеток, приблизительно 250 миллионов клеток, приблизительно 350 миллионов клеток, приблизительно 450 миллионов клеток, приблизительно 650 миллионов клеток, приблизительно 800 миллионов клеток, приблизительно 900 миллионов клеток, приблизительно 3 миллиардов клеток, приблизительно 30 миллиардов клеток, приблизительно 45 миллиардов клеток) или любое значение между указанными пределами и/или на килограмм массы тела. Дозы могут изменяться в зависимости от признаков, определенных для заболевания или нарушения, и/или пациента, и/или другого лечения.

[0571] В некоторых вариантах осуществления доза клеток является постоянной дозой клеток или фиксированной дозой клеток, такой, что доза клеток не связана или не

основана на площади поверхности или массе тела субъекта.

[0572] В некоторых вариантах осуществления доза генетически модифицированных клеток включает от или от приблизительно  $1 \times 10^5$  до  $5 \times 10^8$  суммарных CAR-экспрессирующих Т-клеток, от  $1 \times 10^5$  до  $2,5 \times 10^8$  суммарных CAR-экспрессирующих Т-клеток, от  $1 \times 10^5$  до  $1 \times 10^8$  суммарных CAR-экспрессирующих Т-клеток, от  $1 \times 10^5$  до  $5 \times 10^7$  суммарных CAR-экспрессирующих Т-клеток, от  $1 \times 10^5$  до  $2,5 \times 10^7$  суммарных CAR-экспрессирующих Т-клеток, от  $1 \times 10^5$  до  $1 \times 10^7$  суммарных CAR-экспрессирующих Т-клеток, от  $1 \times 10^5$  до  $5 \times 10^6$  суммарных CAR-экспрессирующих Т-клеток, от  $1 \times 10^5$  до  $2,5 \times 10^6$  суммарных CAR-экспрессирующих Т-клеток, от  $1 \times 10^5$  до  $1 \times 10^6$  суммарных CAR-экспрессирующих Т-клеток, от  $1 \times 10^6$  до  $5 \times 10^8$  суммарных CAR-экспрессирующих Т-клеток, от  $1 \times 10^6$  до  $2,5 \times 10^8$  суммарных CAR-экспрессирующих Т-клеток, от  $1 \times 10^6$  до  $1 \times 10^8$  суммарных CAR-экспрессирующих Т-клеток, от  $1 \times 10^6$  до  $5 \times 10^7$  суммарных CAR-экспрессирующих Т-клеток, от  $1 \times 10^6$  до  $2,5 \times 10^7$  суммарных CAR-экспрессирующих Т-клеток, от  $1 \times 10^6$  до  $1 \times 10^7$  суммарных CAR-экспрессирующих Т-клеток, от  $1 \times 10^6$  до  $5 \times 10^6$  суммарных CAR-экспрессирующих Т-клеток, от  $1 \times 10^6$  до  $2,5 \times 10^6$  суммарных CAR-экспрессирующих Т-клеток, от  $2,5 \times 10^6$  до  $5 \times 10^8$  суммарных CAR-экспрессирующих Т-клеток, от  $2,5 \times 10^6$  до  $2,5 \times 10^8$  суммарных CAR-экспрессирующих Т-клеток, от  $2,5 \times 10^6$  до  $1 \times 10^8$  суммарных CAR-экспрессирующих Т-клеток, от  $2,5 \times 10^6$  до  $5 \times 10^7$  суммарных CAR-экспрессирующих Т-клеток, от  $2,5 \times 10^6$  до  $2,5 \times 10^7$  суммарных CAR-экспрессирующих Т-клеток, от  $2,5 \times 10^6$  до  $1 \times 10^7$  суммарных CAR-экспрессирующих Т-клеток, от  $2,5 \times 10^6$  до  $5 \times 10^6$  суммарных CAR-экспрессирующих Т-клеток, от  $5 \times 10^6$  до  $5 \times 10^8$  суммарных CAR-экспрессирующих Т-клеток, от  $5 \times 10^6$  до  $2,5 \times 10^8$  суммарных CAR-экспрессирующих Т-клеток, от  $5 \times 10^6$  до  $1 \times 10^8$  суммарных CAR-экспрессирующих Т-клеток, от  $5 \times 10^6$  до  $5 \times 10^7$  суммарных CAR-экспрессирующих Т-клеток, от  $5 \times 10^6$  до  $2,5 \times 10^7$  суммарных CAR-экспрессирующих Т-клеток, от  $5 \times 10^6$  до  $1 \times 10^7$  суммарных CAR-экспрессирующих Т-клеток, от  $1 \times 10^7$  до  $5 \times 10^8$  суммарных CAR-экспрессирующих Т-клеток, от  $1 \times 10^7$  до  $2,5 \times 10^8$  суммарных CAR-экспрессирующих Т-клеток, от  $1 \times 10^7$  до  $5 \times 10^7$  суммарных CAR-экспрессирующих Т-клеток, от  $1 \times 10^7$  до  $2,5 \times 10^7$  суммарных CAR-экспрессирующих Т-клеток, от  $2,5 \times 10^7$  до  $5 \times 10^8$  суммарных CAR-экспрессирующих Т-клеток, от  $2,5 \times 10^7$  до  $2,5 \times 10^8$  суммарных CAR-экспрессирующих Т-клеток, от  $2,5 \times 10^7$  до  $1 \times 10^8$  суммарных CAR-экспрессирующих Т-клеток, от  $2,5 \times 10^7$  до  $5 \times 10^7$  суммарных CAR-экспрессирующих Т-клеток, от  $5 \times 10^7$  до  $5 \times 10^8$  суммарных CAR-экспрессирующих Т-клеток, от  $5 \times 10^7$  до  $2,5 \times 10^8$  суммарных CAR-экспрессирующих Т-клеток, от  $5 \times 10^7$  до  $1 \times 10^8$  суммарных CAR-экспрессирующих Т-клеток, от  $1 \times 10^8$  до  $5 \times 10^8$  суммарных CAR-экспрессирующих Т-клеток, от  $1 \times 10^8$  до  $2,5 \times 10^8$  суммарных CAR-экспрессирующих Т-клеток или от  $2,5 \times 10^8$  до  $5 \times 10^8$  суммарных CAR-экспрессирующих Т-клеток.

[0573] В некоторых вариантах осуществления, например, когда субъектом является человек, доза включает меньше чем приблизительно  $1 \times 10^8$  суммарных экспрессирующих рекомбинантный рецептор (например, CAR) клеток, Т-клеток или мононуклеарных клеток



периферической крови (МКПК), например, в пределах от приблизительно  $1 \times 10^6$  до  $1 \times 10^8$  таких клеток, например,  $2 \times 10^6$ ,  $5 \times 10^6$ ,  $1 \times 10^7$ ,  $5 \times 10^7$  или  $1 \times 10^8$  таких суммарных клеток или в пределах между любыми двумя из предыдущих значений. В некоторых вариантах осуществления, когда субъектом является человек, доза включает от приблизительно  $1 \times 10^6$  до  $3 \times 10^8$  суммарных экспрессирующих рекомбинантный рецептор (например, CAR) клеток, например, в пределах от приблизительно  $1 \times 10^7$  до  $2 \times 10^8$  таких клеток, например,  $1 \times 10^7$ ,  $5 \times 10^7$ ,  $1 \times 10^8$  или  $1,5 \times 10^8$  таких суммарных клеток или в пределах между любыми двумя из предыдущих значений. В некоторых вариантах осуществления пациенту вводят множество доз, причем каждая из доз или суммарная доза может быть в пределах любого из предыдущих значений. В некоторых вариантах осуществления доза клеток включает введение от  $1 \times 10^5$  до  $5 \times 10^8$  или от приблизительно  $1 \times 10^5$  до приблизительно  $5 \times 10^8$  суммарных экспрессирующих рекомбинантный рецептор Т-клеток или суммарных Т-клеток, от  $1 \times 10^5$  до  $1 \times 10^8$  или от приблизительно  $1 \times 10^5$  до приблизительно  $1 \times 10^8$  суммарных экспрессирующих рекомбинантный рецептор Т-клеток или суммарных Т-клеток, от  $5 \times 10^5$  до  $1 \times 10^7$  или от приблизительно  $5 \times 10^5$  до приблизительно  $1 \times 10^7$  суммарных экспрессирующих рекомбинантный рецептор Т-клеток или суммарных Т-клеток, или от  $1 \times 10^6$  до  $1 \times 10^7$  или от приблизительно  $1 \times 10^6$  до приблизительно  $1 \times 10^7$  суммарных экспрессирующих рекомбинантный рецептор Т-клеток или суммарных Т-клеток, все включительно.

[0574] В некоторых вариантах осуществления Т-клетки дозы включают CD4+ Т-клетки, CD8+ Т-клетки или CD4+ и CD8+ Т-клетки.

[0575] В некоторых вариантах осуществления, например, когда субъект является человеком, CD8+ Т-клетки дозы, в том числе в дозе, включающей CD4+ и CD8+ Т-клетки, включают от приблизительно  $1 \times 10^6$  до  $1 \times 10^8$  суммарных экспрессирующих рекомбинантный рецептор (например, CAR) CD8+ клеток, например, в пределах от приблизительно  $5 \times 10^6$  до  $1 \times 10^8$  таких клеток, например,  $1 \times 10^7$ ,  $2,5 \times 10^7$ ,  $5 \times 10^7$ ,  $7,5 \times 10^7$  или  $1 \times 10^8$  таких суммарных клеток или в пределах между любыми двумя из предыдущих значений. В некоторых вариантах осуществления пациенту вводят множество доз, причем каждая из доз или суммарная доза может быть в пределах любого из предыдущих значений. В некоторых вариантах осуществления доза клеток включает введение от  $1 \times 10^7$  до  $0,75 \times 10^8$  или от приблизительно  $1 \times 10^7$  до приблизительно  $0,75 \times 10^8$  суммарных экспрессирующих рекомбинантный рецептор CD8+ Т-клеток, от  $1 \times 10^7$  до  $2,5 \times 10^7$  или от приблизительно  $1 \times 10^7$  до приблизительно  $2,5 \times 10^7$  суммарных экспрессирующих рекомбинантный рецептор CD8+ Т-клеток, от  $1 \times 10^7$  до  $0,75 \times 10^8$  или от приблизительно  $1 \times 10^7$  до приблизительно  $0,75 \times 10^8$  суммарных экспрессирующих рекомбинантный рецептор CD8+ Т-клеток, все включительно. В некоторых вариантах осуществления доза клеток включает введение  $1 \times 10^7$ ,  $2,5 \times 10^7$ ,  $5 \times 10^7$ ,  $7,5 \times 10^7$  или  $1 \times 10^8$  или приблизительно  $1 \times 10^7$ ,  $2,5 \times 10^7$ ,  $5 \times 10^7$ ,  $7,5 \times 10^7$  или  $1 \times 10^8$  суммарных экспрессирующих рекомбинантный рецептор CD8+ Т-клеток.

[0576] В некоторых вариантах осуществления, например, когда субъект является

человеком, CD4+ Т-клетки дозы, в том числе в дозе, включающей CD4+ и CD8+ Т-клетки, включают от приблизительно  $1 \times 10^6$  до  $1 \times 10^8$  суммарных экспрессирующих рекомбинантный рецептор (например, CAR) CD4+ клеток, например, в пределах от приблизительно  $5 \times 10^6$  до  $1 \times 10^8$  таких клеток, например,  $1 \times 10^7$ ,  $2,5 \times 10^7$ ,  $5 \times 10^7$ ,  $7,5 \times 10^7$  или  $1 \times 10^8$  таких суммарных клеток или в пределах между любыми двумя из предыдущих значений. В некоторых вариантах осуществления пациенту вводят множество доз, причем каждая из доз или суммарная доза может быть в пределах любого из предыдущих значений. В некоторых вариантах осуществления доза клеток включает введение от  $1 \times 10^7$  до  $0,75 \times 10^8$  или от приблизительно  $1 \times 10^7$  до приблизительно  $0,75 \times 10^8$  суммарных экспрессирующих рекомбинантный рецептор CD4+ Т-клеток, от  $1 \times 10^7$  до  $2,5 \times 10^7$  или от приблизительно  $1 \times 10^7$  до приблизительно  $2,5 \times 10^7$  суммарных экспрессирующих рекомбинантный рецептор CD4+ Т-клеток, от  $1 \times 10^7$  до  $0,75 \times 10^8$  или от приблизительно  $1 \times 10^7$  до приблизительно  $0,75 \times 10^8$  суммарных экспрессирующих рекомбинантный рецептор CD4+ Т-клеток, все включительно. В некоторых вариантах осуществления доза клеток включает введение  $1 \times 10^7$ ,  $2,5 \times 10^7$ ,  $5 \times 10^7$ ,  $7,5 \times 10^7$  или  $1 \times 10^8$  или приблизительно  $1 \times 10^7$ ,  $2,5 \times 10^7$ ,  $5 \times 10^7$ ,  $7,5 \times 10^7$  или  $1 \times 10^8$  суммарных экспрессирующих рекомбинантный рецептор CD4+ Т-клеток.

[0577] В некоторых вариантах осуществления дозу клеток, например, Т-клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор, вводят субъекту в виде однократной дозы или вводят только один раз в течение периода длительностью две недели, один месяц, три месяца, шесть месяцев, 1 год или больше.

[0578] В контексте адоптивной клеточной терапии введение данной "дозы" охватывает введение данного количества или количества клеток в виде одной композиции и/или одного непрерывного введения, например, в виде однократной инъекции или непрерывной инфузии, и также охватывает введение данного количества или числа клеток в виде дробной дозы или в виде множества композиций, представленных во множестве отдельных композиций или инфузий, в течение установленного периода времени, такого как не больше 3 дней. Таким образом, в некоторых контекстах доза является однократным или непрерывным введением конкретного количества клеток, сделанным или начатым в одной временной точке. В некоторых контекстах, тем не менее, дозу вводят в многократных инъекциях или инфузиях в течение не больше чем трех дней, например, один раз в день в течение трех дней или в течение двух дней, или путем многократных инфузий в течение одних суток.

[0579] Таким образом, в некоторых аспектах клетки дозы вводят в одной фармацевтической композиции. В некоторых вариантах осуществления клетки дозы вводят во множестве композиций, в совокупности содержащих клетки дозы.

[0580] В некоторых вариантах осуществления термин "дробная доза" относится к дозе, разделенной так, что ее вводят в течение больше чем одного дня. Такой тип введения доз охвачен настоящими способами и считается однократной дозой.

[0581] Таким образом, дозу клеток могут вводить в виде дробной дозы, например

дробной дозы, вводимой в течение некоторого времени. Например, в некоторых вариантах осуществления дозу могут вводить субъекту в течение 2 дней или в течение 3 дней. Примерные способы введения дробных доз включают введение 25% дозы в первый день и введение оставшихся 75% дозы во второй день. В других вариантах осуществления 33% дозы могут вводить в первый день, а оставшиеся 67% вводят во второй день. В некоторых аспектах 10% дозы вводят в первый день, 30% дозы вводят во второй день и 60% дозы вводят в третий день. В некоторых вариантах осуществления дробная доза распространяется не больше чем на 3 дня.

[0582] В некоторых вариантах осуществления клетки дозы могут вводить путем введения множества композиций или растворов, таких как первый и второй, необязательно больше, при этом каждый содержит некоторое количество клеток дозы. В некоторых аспектах множество композиций, каждая из которых содержит разные популяции и/или подтипы клеток, вводят отдельно или независимо, необязательно в течение определенного периода времени. Например, популяции или подтипы клеток могут включать CD8+ и CD4+ Т-клетки, соответственно, и/или CD8+ и CD4+ обогащенные популяции, соответственно, например, каждые из CD4+ и/или CD8+ Т-клеток индивидуально включают клетки, генетически модифицированные для экспрессии рекомбинантного рецептора. В некоторых вариантах осуществления введение дозы включает введение первой композиции, включающей дозу CD8+ Т-клеток или дозу CD4+ Т-клеток, и введение второй композиции, включающей другую дозу CD4+ Т-клеток и CD8+ Т-клеток.

[0583] В некоторых вариантах осуществления введение композиции или дозы, например введение множества композиций клеток, включает введение композиций клеток отдельно. В некоторых вариантах осуществления композиции клетки являются отдельными готовыми композициями, полученными предложенными способами, такими как описано в Разделе I. В некоторых аспектах отдельные введения выполняют одновременно или последовательно, в любом порядке. В некоторых вариантах осуществления доза включает первую композицию и вторую композицию, причем первую композицию и вторую композицию вводят с интервалом от 0 до 12 часов, с интервалом от 0 до 6 часов или с интервалом от 0 до 2 часов. В некоторых вариантах осуществления начало введения первой композиции и начало введения второй композиции выполняют с интервалом не больше 2 часов, не больше 1 часа или не больше 30 минут, с интервалом не больше 15 минут, не больше 10 минут или не больше 5 минут. В некоторых вариантах осуществления начало и/или завершение введения первой композиции и завершение и/или начало введения второй композиции выполняют с интервалом не больше 2 часов, не больше 1 часа или не больше 30 минут, с интервалом не больше 15 минут, не больше 10 минут или не больше 5 минут.

[0584] В некоторой композиции первая композиция, например первая композиция дозы, включает CD4+ Т-клетки. В некоторой композиции первая композиция, например первая композиция дозы, включает CD8+ Т-клетки. В некоторых вариантах

осуществления первую композицию вводят до второй композиции.

[0585] В некоторых вариантах осуществления доза или композиция клеток включает определенное или целевое отношение CD4+ Т-клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор, к CD8+ Т-клеткам, экспрессирующим рекомбинантный рецептор, и/или CD4+ Т-клеток к CD8+ Т-клеткам, где указанное отношение необязательно составляет приблизительно 1:1 или от приблизительно 1:3 до приблизительно 3:1, такое как приблизительно 1:1. В некоторых аспектах введение композиции или дозы с целевым или требуемым отношением различных популяций клеток (таким как отношение CD4+:CD8+ или отношение CAR+CD4+:CAR+CD8+, например, 1:1) включает введение композиции клеток, содержащей одну из популяций и затем введение отдельной композиции клеток, включающей другую популяцию, где введение осуществляют при или приблизительно при целевом или требуемом отношении. В некоторых аспектах введение дозы или композиции клеток в определенном отношении приводит к улучшенной экспансии, персистированию и/или противоопухолевой активности Т-клеточной терапии.

[0586] В некоторых вариантах осуществления субъект получает многократные дозы, например, две или больше доз, или многократные последующие дозы, клеток. В некоторых вариантах осуществления субъекту вводят две дозы. В некоторых вариантах осуществления субъект получает последующую дозу, например, вторую дозу вводят через приблизительно 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 или 21 день после первой дозы. В некоторых вариантах осуществления многократные последующие дозы вводят после первой дозы, при этом дополнительную дозу или дозы вводят после введения последующей дозы. В некоторых аспектах количество клеток, вводимых субъекту в дополнительной дозе, является таким же или подобным первой дозе и/или последующей дозе. В некоторых вариантах осуществления дополнительная доза или дозы больше, чем предыдущие дозы.

[0587] В некоторых аспектах величину первой и/или последующей дозы определяют на основе одного или более критериев, таких как ответ субъекта на предшествующее лечение, например химиотерапию, время заболевания у субъекта, например, опухолевая нагрузка, масса, размер или степень, степень или тип метастазирования, стадия, и/или вероятность или частота развивающихся у субъекта токсических последствий, например, CRS, синдрома активации макрофагов, синдрома распада опухоли, нейротоксичности и/или иммунного ответа организма против вводимых клеток и/или рекомбинантных рецепторов.

[0588] В некоторых аспектах время между введением первой дозы и введением последующей дозы составляет от приблизительно 9 до приблизительно 35 дней, от приблизительно 14 до приблизительно 28 дней или 15-27 дней. В некоторых вариантах осуществления введение последующей дозы производят больше чем через приблизительно 14 дней и меньше чем через приблизительно 28 дней после введения первой дозы. В некоторых аспектах время между первой и последующей дозой составляет

приблизительно 21 день. В некоторых вариантах осуществления дополнительную дозу или дозы, например последующие дозы, вводят после введения последующей дозы. В некоторых аспектах дополнительную последующую дозу или дозы вводят по меньшей мере через приблизительно 14 и меньше чем через приблизительно 28 дней после введения предшествующей дозы. В некоторых вариантах осуществления дополнительную дозу вводят меньше чем через приблизительно 14 дней после предшествующей дозы, например, через 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 или 13 дней после предшествующей дозы. В некоторых вариантах осуществления никакую дозу не вводят меньше чем через приблизительно 14 дней после предшествующей дозы и/или никакую дозу не вводят больше чем через приблизительно 28 дней после предшествующей дозы.

[0589] В некоторых вариантах осуществления доза клеток, например, клеток, экспрессирующих рекомбинантных рецептор, включает две дозы (например, двойную дозу), включающие первую дозу Т-клеток и последующую дозу Т-клеток, где одна или обе из первой дозы и второй дозы включают введение дробной дозы Т-клеток.

[0590] В некоторых вариантах осуществления доза клеток обычно является достаточно большой, чтобы быть эффективной при уменьшении бремени заболевания.

[0591] В некоторых вариантах осуществления клетки вводят в требуемой дозе, в некоторых аспектах включающей требуемую дозу или количество клеток, или тип(ы) клеток и/или требуемое отношение типов клеток. Таким образом, доза клеток в некоторых вариантах осуществления основана на общем количестве клеток (или числе на кг массы тела) и требуемом отношении отдельных популяций или подтипов, таком как отношение CD4+ к CD8+. В некоторых вариантах осуществления доза клеток основана на требуемом суммарном количестве (или числе на кг массы тела) клеток в отдельных популяциях или отдельных типов клеток. В некоторых вариантах осуществления доза основана на комбинации таких особенностей, таких как требуемое количество всех клеток, требуемое отношение и требуемое общее количество клеток в отдельных популяциях.

[0592] В некоторых вариантах осуществления популяции или подтипы клеток, таких как CD8+ и CD4+ Т-клетки, вводят при или в пределах переносимого различия требуемой дозы всех клеток, такой как требуемая доза Т-клеток. В некоторых аспектах требуемая доза представляет собой требуемое количество клеток или требуемое количество клеток на единицу массы тела субъекта, которому вводят клетки, например, клеток/кг. В некоторых аспектах требуемая доза находится на уровне или выше минимального количества клеток или минимального количества клеток на единицу массы тела. В некоторых аспектах среди всех клеток, вводимых в требуемой дозе, присутствуют отдельные популяции или подтипы с или приблизительно требуемым отношением на выходе (таким как отношение CD4+ к CD8+), например, в пределах некоторого переносимого различия или погрешности такого отношения.

[0593] В некоторых вариантах осуществления клетки вводят при или в пределах переносимого различия требуемой дозы одной или больше отдельных популяций или подтипов клеток, такой как требуемая доза CD4+ Т-клеток и/или требуемая доза CD8+ Т-

клеток. В некоторых аспектах требуемая доза представляет собой требуемое количество клеток подтипа или популяции или требуемое количество таких клеток на единицу массы тела субъекта, которому вводят клетки, например, клеток/кг. В некоторых аспектах требуемая доза находится на уровне или выше минимального количества клеток популяции или подтипа или минимального количества клеток популяции или подтипа на единицу массы тела.

[0594] Таким образом, в некоторых вариантах осуществления доза основана на требуемой фиксированной дозе всех клеток и требуемом отношении, и/или основана на требуемой фиксированной дозе одного или более, например каждого из, отдельных подтипов или субпопуляций. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления доза основана на требуемой фиксированной или минимальной дозе Т-клеток и требуемом отношении CD4+ к CD8+ Т-клеткам, и/или основана на требуемой фиксированной или минимальной дозе CD4+ и/или CD8+ Т-клеток.

[0595] В некоторых вариантах осуществления клетки вводят в или в пределах переносимого диапазона требуемого отношения на выходе множества популяций или подтипов клеток, таких как CD4+ и CD8+ Т-клетки или подтипы. В некоторых аспектах требуемое отношение может быть определенным отношением или может быть диапазоном отношений. Например, в некоторых вариантах осуществления требуемое отношение (например, отношение CD4+ к CD8+ Т-клеткам) составляет от или от приблизительно 5:1 до или до приблизительно 5:1 (или больше чем приблизительно 1:5 и меньше чем приблизительно 5:1), или от или от приблизительно 1:3 до или до приблизительно 3:1 (или больше чем приблизительно 1:3 и меньше чем приблизительно 3:1), такое как от или от приблизительно 2:1 до или до приблизительно 1:5 (или больше чем приблизительно 1:5 и меньше чем приблизительно 2:1, такое как или приблизительно 5:1, 4,5:1, 4:1, 3,5:1, 3:1, 2,5:1, 2:1, 1,9:1, 1,8:1, 1,7:1, 1,6:1, 1,5:1, 1,4:1, 1,3:1, 1,2:1, 1,1:1, 1:1, 1:1,1, 1:1,2, 1:1,3, 1:1,4, 1:1,5, 1:1,6, 1:1,7, 1:1,8, 1:1,9, 1:2, 1:2,5, 1:3, 1:3,5, 1:4, 1:4,5 или 1:5. В некоторых аспектах переносимое различие составляет в пределах приблизительно 1%, приблизительно 2%, приблизительно 3%, приблизительно 4% приблизительно 5%, приблизительно 10%, приблизительно 15%, приблизительно 20%, приблизительно 25%, приблизительно 30%, приблизительно 35%, приблизительно 40%, приблизительно 45%, приблизительно 50% требуемого отношения, включая любое значение между указанными диапазонами. В некоторых вариантах осуществления композиции обогащенных CD4+ Т-клеток и обогащенных CD8+ Т-клеток комбинируют в требуемом отношении и вводят субъекту в виде одной композиции клеток. В конкретном варианте осуществления композиции обогащенных CD4+ Т-клеток и обогащенных CD8+ Т-клеток вводят в виде отдельных композиций в требуемом отношении.

[0596] В конкретных вариантах осуществления количества и/или концентрации клеток относятся к количеству клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор (например, CAR). В других вариантах осуществления количества и/или концентрации клеток относятся к количеству или концентрации всех вводимых клеток, Т-клеток или

моноклеарных клеток периферической крови (МКПК).

[0597] В некоторых аспектах величину дозы определяют на основе одного или более критериев, таких как ответ субъекта на предшествующее лечение, например, химиотерапию, бремя заболевания у субъекта, например, опухолевая нагрузка, масса, размер или степень, степень или тип метастазирования, стадия и/или вероятность, или уровень развивающихся у субъекта токсических последствий, например, CRS, синдрома активации макрофагов, синдрома распада опухоли, нейротоксичности и/или иммунного ответа организма против вводимых клеток и/или рекомбинантных рецепторов.

[0598] В некоторых вариантах осуществления способы также включают введение одной или более дополнительных доз клеток, экспрессирующих химерный антигенный рецептор (CAR), и/или лимфодеплеционной терапии и/или повтор одного или более этапов способов. В некоторых вариантах осуществления одна или более дополнительных доз являются такими же, как начальная доза. В некоторых вариантах осуществления одна или более дополнительных доз отличаются от начальной дозы, например, выше, например, в 2 раза, в 3 раза, в 4 раза, в 5 раз, в 6 раз, в 7 раз, в 8 раз, в 9 раз или в 10 раз или более раз выше, чем начальная доза, или ниже, например, ниже, например, в 2 раза, в 3 раза, в 4 раза, в 5 раз, в 6 раз, в 7 раз, в 8 раз, в 9 раз или в 10 раз или более раз ниже, чем начальная доза. В некоторых вариантах осуществления введение одной или более дополнительных доз определяют на основе ответа субъекта на первоначальное лечение или любое предшествующее лечение, бремя заболевания у субъекта, например, опухолевая нагрузка, масса, размер или степень, степень или тип метастазирования, стадия и/или вероятность или частота развития у субъекта токсических последствий, например, CRS, синдрома активации макрофагов, синдрома распада опухоли, нейротоксичности и/или иммунного ответа организма против вводимых клеток и/или рекомбинантных рецепторов.

#### **А. Ответ, активность и выживаемость**

[0599] В некоторых вариантах осуществления клетки, например, готовые клетки, получаемые в способах, предложенных в настоящем документе, например, таких как описано в Разделе I, вводят субъекту и наблюдают у субъекта ответ, выживаемость и/или признаки или симптомы токсического действия.

[0600] В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 35%, по меньшей мере 40% или по меньшей мере 50% субъектов, получавших композиции клеток, например, терапевтические композиции клеток, содержащих CAR+ CD4+ и CD8+ Т-клетки, демонстрируют ремиссию (CR); и/или по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60% или по меньшей мере 70% субъектов, подвергнутых лечению согласно способу, достигается объективный ответ (ORR). В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере 50% субъектов, по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере 60% субъектов, по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере 70% субъектов, по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере 80% субъектов или по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере

мере 90% субъектов, подвергнутых лечению согласно способу, достигают CR и/или достигают объективного ответа (OR). В некоторых вариантах осуществления критерии оценки эффективности лечения включают общий процент пациентов с объективным ответом (ORR), полный ответ (CR), выживаемость без прогрессирования (PFS) продолжительность ответа (DOR) и/или общая выживаемость (OS).

[0601] В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 40% или по меньшей мере 50% субъектов, подвергнутых лечению согласно способам, предложенным в настоящем документе, достигают полной ремиссии (CR), демонстрируют выживаемость без прогрессирования (PFS) и/или общую выживаемость (OS) больше чем или больше чем приблизительно 3 месяца, 6 месяцев или 12 месяцев; в среднем субъекты, подвергнутые лечению согласно способу, демонстрируют медианную PFS или OS больше чем или больше чем приблизительно 6 месяцев, 12 месяцев или 18 месяцев; и/или субъект демонстрирует PFS или OS после терапии в течение по меньшей мере или приблизительно 6, 12, 18 или больше месяцев.

[0602] В некоторых аспектах процент случаев объективного ответа у субъектов, таких как субъекты с НХЛ, основаны на критериях Лугано (Cheson et al., (2014) JCO 32(27):3059-3067; Johnson et al., (2015) Radiology 2:323-338; Cheson, B.D. (2015) Chin Clin Oncol 4(1):5). В некоторых аспектах при оценке ответа используют любой из клинических, гематологических и/или молекулярных методов. В некоторых аспектах оценка ответа с использованием критериев Лугано включает применение позитронной эмиссионной томографии (ПЭТ)-компьютерной томографии (КТ) и/или КТ в соответствующих случаях. Оценки ПЭТ-КТ могут дополнительно включать использование фтордезоксиглюкозы (ФДГ) для ФДГ-авидных лимфом. В некоторых аспектах, при использовании ПЭТ-КТ для оценки ответа в случае ФДГ-авидной гистологии, могут использовать 5-балльную шкалу. В некотором отношении 5-балльная шкала включает следующие критерии: 1, нет накопления с превышением фона; 2, накопление  $\leq$ средостения; 3, накопление  $>$ средостения, но  $\leq$ печени; 4, накопление умеренно  $>$ печени; 5, накопление заметно выше печени и/или новые очаги; X, новые области накопления, с малой вероятностью связанные с лимфомой.

[0603] В некоторых аспектах полный ответ, как описано с использованием критериев Лугано, включает полный метаболический ответ и полный радиологический ответ в различных поддающихся измерению участках. В некоторых аспектах эти участки включают лимфатические узлы и внелимфатические участки, где CR описан оценкой 1, 2 или 3 балла с или без остаточной массы по 5-балльной шкале в случае использования ПЭТ-КТ. В некоторых аспектах, в кольце Вальдейера или экстранодальных участках с высоким физиологическим накоплением или при активации в селезенке или костном мозге (например, в результате химиотерапии или воздействия миелоидных колониестимулирующих факторов), накопление может быть больше, чем в нормальном средостении и/или печени. При этом обстоятельстве полный метаболический ответ может быть определить, если накопление на участках первичного поражения не выше, чем в



окружающей нормальной ткани, даже если ткань имеет высокое физиологическое накопление. В некоторых аспектах ответ оценивают в лимфатических узлах при использовании КТ, где CR описывают как отсутствие внелимфатических участков заболевания, при этом целевые узлы/узловые массы должны показать регрессию до  $\leq 1,5$  см по наибольшему поперечному диаметру очага (LDi). Другие участки оценки включают костный мозг, в котором оценка на основе ПЭТ-КТ должна показывать отсутствие ФДГ-avidной патологии в костном мозге, а оценка на основе КТ должна показывать нормальную морфологию, которая в случае невозможности четкого определения должна быть ИГХ-отрицательной. Дополнительные участки могут включать оценку увеличения органов, которые должны уменьшаться до нормальных значений. В некоторых аспектах оценивают неизмеренные очаги и новые очаги, которые в случае CR должны отсутствовать (Cheson et al., (2014) JCO 32(27):3059-3067; Johnson et al., (2015) Radiology 2:323-338; Cheson, B.D. (2015) Chin Clin Oncol 4(1):5).

[0604] В некоторых аспектах частичный ответ (PR; также известный в некоторых случаях как частичная ремиссия), как описано с использованием критериев Лугано, включает частичный метаболический и/или радиологический ответ в различных поддающихся измерению участках. В некоторых аспектах эти участки включают лимфатические узлы и внелимфатические участки, где PR описывается оценкой 4 или 5 баллов с уменьшенным накоплением по сравнению с исходным уровнем и остаточной массой(ами) любого размера, в случае использования ПЭТ-КТ. В промежуточном анализе такие результаты могут указывать на ответ заболевания на лечение. В конце лечения такие результаты могут указывать на остаточное заболевание. В некоторых аспектах ответ оценивают в лимфатических узлах с использованием КТ, где PR описывают как  $\geq 50\%$  уменьшение СПД до 6 целевых измеримых узлов и экстранодальных участков. Если поражение слишком маленькое для измерения на КТ, в качестве значения по умолчанию назначают  $5 \text{ мм} \times 5 \text{ мм}$ ; если поражение больше не видно, значение составляет  $0 \text{ мм} \times 0 \text{ мм}$ ; для узла  $>5 \text{ мм} \times 5 \text{ мм}$ , но меньше нормального, для расчета используют фактические измерения. Другие участки оценки включают костный мозг, где оценка на основе ПЭТ-КТ должна указывать остаточное накопление выше, чем накопление в нормальном костном мозге, но сниженное по сравнению с исходным уровнем (диффузное накопление соответствует реактивным изменениям при разрешенной химиотерапии). В некоторых аспектах, если имеются постоянные очаговые изменения в костном мозге в контексте узлового ответа, следует рассматривать возможность дальнейшей оценки с помощью МРТ, биопсии или сканирования с интервалами. В некоторых аспектах дополнительные участки могут включать оценку увеличения органов, при котором длина селезенки должна уменьшаться на  $>50\%$  по сравнению с нормальным значением. В некоторых аспектах оценивают неизмеренные очаги и новые очаги, которые в случае PR должны отсутствовать/быть нормальными, регрессировать, но не увеличиваться. Не отвечающее/стабильное заболевание (SD) или прогрессирующее заболевание (PD) также можно измерять при использовании оценок на основе ПЭТ-КТ и/или КТ (Cheson et al.,

(2014) JCO 32(27):3059-3067; Johnson et al., (2015) Radiology 2:323-338; Cheson, B.D. (2015) Chin Clin Oncol 4(1):5).

[0605] В некоторых отношениях выживаемость без прогрессирования (PFS) описывается как промежуток времени в течение и после лечения заболевания, такого как рак, когда субъект живет с заболеванием, но оно не ухудшается. В некоторых аспектах объективный ответ (OR) описывается как поддающийся измерению ответ. В некоторых аспектах частота объективного ответа (ORR) описывается как процент пациентов, достигших CR или PR. В некоторых аспектах общая выживаемость (OS) описывается как промежуток времени либо от даты постановки диагноза, либо начала лечения заболевания, такого как рак, в течение которого субъекты, у которых диагностировано заболевание, остаются в живых. В некоторых аспектах безрецидивная выживаемость (EFS) описывается как промежуток времени после окончания лечения рака, когда субъект не имеет определенных осложнений или событий, развитие которых лечение должно было предотвратить или задержать. Эти события могут включать возврат рака или появление некоторых симптомов, таких как боль в кости при раке, который распространился в кость, или смерть.

[0606] В некоторых вариантах осуществления показатель продолжительности ответа (DOR) включает время от задокументированного ответа опухоли на лечение до прогрессирования заболевания. В некоторых вариантах осуществления параметр для оценки ответа может включать стойкий ответ, например, ответ, который сохраняется после некоторого периода времени от начала терапии. В некоторых вариантах осуществления стойкий ответ указывает процент субъектов с ответом приблизительно через 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 18 или 24 месяца после начала терапии. В некоторых вариантах осуществления ответ сохраняется в течение больше чем 3 месяцев или больше чем 6 месяцев.

[0607] В некоторых аспектах критерии RECIST используются для определения объективного ответа опухоли; в некоторых аспектах при солидных опухолях (Eisenhauer et al., European Journal of Cancer 45 (2009) 228-247). В некоторых аспектах критерии RECIST используются для определения объективного ответа опухоли для целевых очагов. В некотором отношении полный ответ, при определении с использованием критериев RECIST, описывают как исчезновение всех целевых очагов, при этом любые патологические лимфатические узлы (целевые или нецелевые) должны демонстрировать уменьшение размера по короткой оси до <10 мм. В других аспектах частичный ответ, при определении с использованием критериев RECIST, описывают как по меньшей мере 30% уменьшение суммы диаметров целевых очагов при использовании в качестве референсных значений исходных сумм диаметров. В других аспектах прогрессирующее заболевание (PD) описывают как по меньшей мере 20% увеличение суммы диаметров целевых очагов при использовании в качестве референсных значений наименьшей суммы в исследовании (это включает исходную сумму, если она является наименьшей в исследовании). В дополнение к относительному увеличению на 20%, сумма также должна

демонстрировать абсолютное увеличение по меньшей мере на 5 мм (в некоторых аспектах появление одного или более новых очагов также считают прогрессией). В других аспектах стабильное заболевание (SD) описывают как отсутствие достаточного уменьшения, чтобы установить PR, и как отсутствие достаточного увеличения, чтобы можно было установить PD, при использовании в качестве референсных значений наименьших сумм диаметров во время исследования.

[0608] Бремя заболевания может охватывать общее количество клеток заболевания у субъекта или в органе, ткани или физиологической жидкости субъекта, таких как орган или ткань опухоли, или другой локализации, например, которые указывают на метастазирование. Например, опухолевые клетки могут быть обнаружены и/или количественно определены в крови или костном мозге в контексте некоторых гемобластных злокачественных новообразований. Бремя заболевания может включать, в некоторых вариантах осуществления, массу опухоли, количество или степень метастазов и/или процент бластных клеток, присутствующих в костном мозге.

[0609] В некоторых вариантах осуществления субъект имеет лейкоз. Степень бремени заболевания может быть определена при оценке остаточного лейкоза в крови или костном мозге.

[0610] В некоторых аспектах процент субъектов с ответом, таких как субъекты с ХЛЛ, основан на критериях ответа Международной рабочей группы по хроническому лимфолейкозу (IWCLL) (Hallek, et al., Blood 2008, Jun 15; 111(12): 5446-5456). В некоторых аспектах эти критерии описывают следующим образом: полная ремиссия (CR; также известная в некоторых случаях как полный ответ), которая в некоторых аспектах требует отсутствия клональных лимфоцитов периферической крови при иммунофенотипировании, отсутствия лимфаденопатии, отсутствия гепатомегалии или спленомегалии, отсутствия симптомов, свидетельствующих о генерализации процесса, и удовлетворительные общие анализы крови; полная ремиссия с неполным восстановлением костного мозга (CRi), в некоторых аспектах описываемая как CR выше, но без нормальных показателей общих анализов крови; частичная ремиссия (PR; также известная в некоторых случаях как частичный ответ), которую в некоторых аспектах описывают как  $\geq 50\%$  снижение количества лимфоцитов,  $\geq 50\%$  сокращение лимфаденопатии или  $\geq 50\%$  уменьшение печени или селезенки, в сочетании с улучшением показателей общих анализов периферической крови; прогрессирующее заболевание (PD), в некоторых аспектах описываемое как  $\geq 50\%$  повышение количества лимфоцитов до  $>5 \times 10^9/\text{л}$ ,  $\geq 50\%$  увеличение лимфаденопатии,  $\geq 50\%$  увеличение размера печени или селезенки, трансформация Рихтера или новые цитопении вследствие ХЛЛ; и стабильное заболевание, в некоторых аспектах описываемое как не соответствующее критериям CR, CRi, PR или PD.

[0611] В некоторых вариантах осуществления субъекты демонстрируют CR или OR, если в течение 1 месяца после введения дозы клеток лимфатические узлы у субъекта имеют размер меньше или меньше чем приблизительно 20 мм, меньше или меньше чем

приблизительно 10 мм или меньше или меньше чем приблизительно 10 мм.

[0612] В некоторых вариантах осуществления индексный клон CLL не обнаружен в костном мозге субъекта (или в костном мозге больше чем 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или более субъектов, подвергнутых лечению согласно методам). В некоторых вариантах осуществления индексный клон CLL оценивают с помощью глубокого секвенирования IgH. В некоторых вариантах осуществления индексный клон не обнаруживают в момент времени через или приблизительно или по меньшей мере через или приблизительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 12, 18 или 24 месяца после введения клеток.

[0613] В некоторых вариантах осуществления субъект демонстрирует морфологическое заболевание, если в костном мозге присутствует большее или равное 5% количество бластных клеток, например, при обнаружении с помощью световой микроскопии, такое как количество, больше или равное 10% бластных клеток в костном мозге, больше или равное 20% бластных клеток в костном мозге, больше или равное 30% бластных клеток в костном мозге, больше или равное 40% бластных клеток в костном мозге или больше или равное 50% бластных клеток в костном мозге. В некоторых вариантах осуществления субъект демонстрирует полную или клиническую ремиссию, если в костном мозге присутствует меньше 5% бластных клеток.

[0614] В некоторых вариантах осуществления субъект имеет лейкоз. Степень бремени заболевания может быть определена при оценке остаточного лейкоза в крови или костном мозге.

[0615] В некоторых вариантах осуществления субъект демонстрирует морфологическое заболевание, если в костном мозге присутствует больше или равное 5% количество бластных клеток, например, при обнаружении с помощью световой микроскопии, такое как количество, больше или равное 10% бластных клеток в костном мозге, больше или равное 20% бластных клеток в костном мозге, больше или равное 30% бластных клеток в костном мозге, больше или равное 40% бластных клеток в костном мозге или больше или равное 50% бластных клеток в костном мозге. В некоторых вариантах осуществления субъект демонстрирует полную или клиническую ремиссию, если в костном мозге присутствует меньше 5% бластных клеток.

[0616] В некоторых вариантах осуществления субъект может демонстрировать полную ремиссию, однако присутствует небольшой процент морфологически необнаружимых (с помощью методов световой микроскопии) остаточных лейкозных клеток. Считается, что субъект демонстрирует минимальное остаточное заболевание (MRD), если субъект демонстрирует менее 5% бластных клеток в костном мозге и демонстрирует молекулярно обнаруживаемый рак. В некоторых вариантах осуществления молекулярно обнаруживаемый рак может быть оценен при использовании любой из множества молекулярных методик, которые позволяют производить чувствительное обнаружение небольшого количества клеток. В некоторых аспектах такие методы включают ПЦР-анализы, которые могут определять уникальные перестройки генов Ig/T-клеточных рецепторов или слияние транскриптов, возникающее при транслокации

хромосом. В некоторых вариантах осуществления проточная цитометрия может использоваться для идентификации раковой клетки на основе лейкоз-специфических иммунофенотипов. В некоторых вариантах осуществления молекулярное обнаружение рака позволяет обнаруживать всего 1 лейкозную клетку в 100000 нормальных клеток. В некоторых вариантах осуществления субъект демонстрирует MRD, которое можно определять молекулярно при обнаружении по меньшей мере 1 или больше чем 1 лейкозной клетки на 100000 клеток, например, с помощью ПЦР или проточной цитометрии. В некоторых вариантах осуществления бремя заболевания у субъекта не поддается молекулярному обнаружению или является MRD-, при этом в некоторых случаях лейкозные клетки не удается обнаружить у субъекта при использовании методов ПЦР или проточной цитометрии.

[0617] В некоторых вариантах осуществления индексный клон лейкоза, например, ХЛЛ, не обнаружен в костном мозге субъекта (или в костном мозге больше чем 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или более субъектов, подвергнутых лечению согласно способам). В некоторых вариантах осуществления индексный клон лейкоза, например, ХЛЛ, оценивают с помощью глубокого секвенирования IGH. В некоторых вариантах осуществления индексный клон не обнаруживают в момент времени через или приблизительно или по меньшей мере через или приблизительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 12, 18 или 24 месяца после введения клеток.

[0618] В некоторых аспектах MRD обнаруживают с помощью проточной цитометрии. Проточная цитометрия может использоваться для мониторинга образцов костного мозга и периферической крови на присутствие раковых клеток. В определенных аспектах проточная цитометрия используется для обнаружения или мониторинга присутствия раковых клеток в костном мозге. В некоторых аспектах многопараметрическое иммунологическое обнаружение с помощью проточной цитометрии используют для обнаружения раковых клеток (см., например, Coustan-Smith et al., (1998) *Lancet* 351:550-554). В некоторых аспектах многопараметрическое иммунологическое обнаружение с помощью масс-цитометрии используют для обнаружения раковых клеток. В некоторых примерах для обнаружения раковых клеток могут использовать 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 или 50 параметров. Антигены, используемые для обнаружения, выбирают в зависимости от обнаруживаемого рака (Foon and Todd (1986) *Blood* 68:1-31).

[0619] В некоторых вариантах осуществления введение дозы или композиции клеток, полученных способами, предложенными в настоящем документе, уменьшает бремя заболевания или состояния, например, количество опухолевых клеток, размер опухоли, долительность выживаемости пациента или бессобытийной выживаемости в большей степени и/или в течение более длительного периода времени по сравнению со снижением, которое наблюдали бы в случае сопоставимого способа с применением клеток, полученных альтернативным процессом. В некоторых вариантах осуществления бремя заболевания или состояния у субъекта определяют, оценивают или измеряют.

Бремя заболевания может быть обнаружено в некоторых аспектах при определении общего количества клеток заболевания или клеток, ассоциированных с заболеванием, например опухолевых клеток, у субъекта или в органе, ткани или физиологической жидкости субъекта, такой как кровь или сыворотка. В некоторых аспектах оценивают выживаемость субъекта, выживаемость в течение определенного периода времени, степень выживаемости, наличие или длительность бессобытийной или бессимптомной выживаемости или безрецидивную выживаемость. В некоторых вариантах осуществления оценивают любой симптом заболевания или состояния. В некоторых вариантах указан показатель бремени заболевания или состояния.

[0620] В некоторых вариантах осуществления показатель бессобытийной выживаемости или общей выживаемости субъекта улучшается в результате введения клеток, полученных в предложенных способах, например, способах, описанных в Разделе I, по сравнению с клеткой, полученной альтернативными способами. Например, в некоторых вариантах осуществления процент субъектов с бессобытийной выживаемостью или вероятностью среди субъектов, подвергнутых лечению способами, через 6 месяцев после введения дозы составляет больше чем приблизительно 40%, больше чем приблизительно 50%, больше чем приблизительно 60%, больше чем приблизительно 70%, больше чем приблизительно 80%, больше чем приблизительно 90% или больше чем приблизительно 95%. В некоторых аспектах общий процент выживаемости составляет больше чем приблизительно 40%, больше чем приблизительно 50%, больше чем приблизительно 60%, больше чем приблизительно 70%, больше чем приблизительно 80%, больше чем приблизительно 90% или больше чем приблизительно 95%. В некоторых вариантах осуществления субъект, получавший клетки, полученные предложенными способами, демонстрирует бессобытийную выживаемость, безрецидивную выживаемость или выживаемость по меньшей мере до 6 месяцев или по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 лет. В некоторых вариантах осуществления время до прогрессирования улучшается, такое как время до прогрессирования больше чем или больше чем приблизительно 6 месяцев или по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 лет.

[0621] В некоторых вариантах осуществления, после лечения согласно настоящему способу, вероятность рецидива уменьшается по сравнению с другими способами, например, способами, в которых субъект получает клеточную терапию, содержащую клетки, полученные альтернативными способами. Например, в некоторых вариантах осуществления вероятность рецидива через 6 месяцев после введения первой дозы составляет меньше чем приблизительно 80%, меньше чем приблизительно 70%, меньше чем приблизительно 60%, меньше чем приблизительно 50%, меньше чем приблизительно 40%, меньше чем приблизительно 30%, меньше чем приблизительно 20% или меньше чем приблизительно 10%.

## **В. Токсическое действие**

[0622] В некоторых вариантах осуществления клетки, например, готовые клетки, полученные способами, предложенными в настоящем документе, например, такими, как

описано в Разделе-I, вводят субъекту и наблюдают субъекта на предмет проявлений или симптомов токсического действия.

[0623] В некоторых вариантах осуществления доза или композиция клеток, например, готовых клеток, полученных предложенными способами, приводит к более низкому уровню и/или более низкой степени токсического действия, токсических последствий или симптома, профиля токсического действия, фактора или свойства, такого как симптом или результат, связанный с или указывающий на синдром высвобождения цитокинов (CRS) или нейротоксичность, например, по сравнению с введением альтернативной клеточной терапии, такой как композиция CAR<sup>+</sup> T-клеток, полученная в альтернативном процессе.

[0624] В некоторых вариантах осуществления введение клеток, полученных предложенными способами, не приводит к высокому показателю или вероятности токсического действия или токсических последствий, или уменьшает частоту или вероятность токсического действия или токсических последствий, таких как нейротоксичность (NT), синдром высвобождения цитокинов (CRS), например, по сравнению с некоторыми другими клеточными терапиями и/или клетками, полученными альтернативными способами. В некоторых вариантах осуществления введение клеток, например, готовых клеток, полученных предложенными способами, приводит к или не повышает риск, тяжелой NT (sNT), тяжелого CRS (sCRS), синдрома активации макрофагов, синдром распада опухоли, повышению температуры по меньшей мере до или приблизительно 38 градусов Цельсия в течение трех или больше дней и уровня СРБ в плазме по меньшей мере 20 мг/дл или приблизительно 20 мг/дл. В некоторых вариантах осуществления больше чем или больше чем приблизительно 30%, 35%, 40%, 50%, 55%, 60% или более субъектов, подвергнутых лечению согласно предложенным способам, не демонстрируют какой либо степени CRS или какой либо степени нейротоксичности. В некоторых вариантах осуществления не больше чем 50% подвергнутых лечению субъектов (например, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90% или более субъектов, подвергнутых лечению) демонстрируют синдром высвобождения цитокинов (CRS) выше 2-й степени и/или нейротоксичность выше 2-й степени. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 50% субъектов, подвергнутых лечению согласно настоящему способу (например, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90% или более субъектов, подвергнутых лечению), не демонстрируют тяжелых токсических последствий (например, тяжелый CRS или тяжелую нейротоксичность), например, не демонстрируют нейротоксичность 3-й степени или более высокую нейротоксичность, и/или не демонстрируют тяжелый CRS или не демонстрируют его в течение некоторого периода времени после лечения, например, в течение недели, двух недель или одного месяца после введения клеток. В некоторых вариантах осуществления параметры, оцениваемые с целью определения некоторых токсических действий, включают нежелательные явления (AE), дозолимитирующую токсичность (DLT), CRS и NT.

[0625] Применение адоптивной Т-клеточной терапии, такое как лечение Т-клетками, экспрессирующими химерные антигенные рецепторы, может вызывать токсические эффекты или последствия, такие как синдром высвобождения цитокинов и нейротоксичность. В некоторых примерах такие эффекты или последствия соответствуют высокому уровню цитокинов в системном кровотоке, что может обуславливать наблюдаемое токсическое действие.

[0626] В некоторых аспектах токсические последствия представляют собой или связаны с, или указывают на синдром высвобождения цитокинов (CRS) или тяжелый CRS (sCRS). CRS, например, sCRS, в некоторых случаях может возникать после адоптивной Т-клеточной терапии и введения субъектам других биологических продуктов. См. Davila et al., *Sci Transl Med* 6, 224ra25 (2014); Brentjens et al., *Sci. Transl. Med.* 5, 177ra38 (2013); Grupp et al., *N. Engl. J. Med.* 368, 1509-1518 (2013); и Kochenderfer et al., *Blood* 119, 2709-2720 (2012); Xu et al., *Cancer Letters* 343 (2014) 172-78.

[0627] Как правило, CRS вызван избыточным системным иммунным ответом, опосредованным, например, Т-клетками, В-клетками, НК-клетками, моноцитами и/или макрофагами. Такие клетки могут высвободить большое количество воспалительных медиаторов, таких как цитокины и хемокины. Цитокины могут вызывать острый воспалительный ответ и/или вызывать эндотелиальную дисфункцию и поражение органов, которое может привести к повышению проницаемости капилляров, сердечной недостаточности или смерти. Тяжелый, угрожающий жизни CRS может привести к легочному инфильтрату и повреждению легких, почечной недостаточности или синдрому диссеминированного внутрисосудистого свертывания. Другие тяжелые, представляющие угрозу для жизни токсические действия могут включать кардиотоксичность, нарушение дыхания, неврологическую токсичность и/или печеночную недостаточность.

[0628] CRS можно лечить с применением противовоспалительной терапии, такой как терапии против ИЛ-6, например, антитела против ИЛ-6, например, тоцилизумаба, или антибиотиков или других средств, как описано. Последствия, признаки и симптомы CRS известны и включают описанные в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления, когда конкретная схема применения или введение влияет или не влияет на данное, ассоциированное с CRS последствие, признак или симптом, могут быть указаны конкретные последствия, признаки и симптомы, и/или их количественные показатели или степени.

[0629] В рамках введения CAR-экспрессирующих клеток, CRS, как правило, возникает через 6-20 дней после инфузии клеток, которые экспрессируют CAR. См. Xu et al., *Cancer Letters* 343 (2014) 172-78. В некоторых случаях CRS возникает меньше чем через 6 дней или больше чем через 20 дней после инфузии CAR Т-клеток. Частота и время возникновения CRS могут быть связаны с исходными уровнями цитокинов или опухолевой нагрузкой на момент инфузии. Обычно CRS включает повышение уровней в сыворотке интерферона (IFN)- $\gamma$ , фактора некроза опухоли (ФНО)- $\alpha$  и/или интерлейкина (IL)-2. Другими цитокинами, которые могут быстро индуцироваться при CRS, являются



IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 и IL-10.

[0630] Примерные последствия, связанные с CRS, включают повышение температуры, дрожь, озноб, гипотензию, одышку, острый респираторный дистресс-синдром (ОРДС), энцефалопатию, повышение АЛТ/АСТ, почечную недостаточность, нарушения со стороны сердца, гипоксию, неврологические нарушения и смерть. Неврологические осложнения включают делирий, судорожную активность, дезориентацию, затруднения при подборе слов, афазию и/или заторможенность. Другие связанные с CRS последствия включают усталость, тошноту, головную боль, судороги, тахикардию, миалгии, сыпь, синдром острой сосудистой утечки, нарушение функции печени и почечную недостаточность. В некоторых аспектах CRS связан с повышением одного или более факторов, таких как ферритин сыворотки, d-димер, аминотрансферазы, лактатдегидрогеназа и триглицериды, или с гипофибриногенемией или гепатоспленомегалией.

[0631] Были разработаны критерии CRS, которые, по-видимому, коррелируют с началом CRS и позволяют прогнозировать, какие пациенты с более высокой вероятностью подвергаются риску развития sCRS (см. Davilla et al., Science translational medicine, 2014; 6(224):224ra25). Факторы включают повышенную температуру, гипоксию, гипотензию, неврологические изменения, повышенные уровни воспалительных цитокинов в сыворотке крови, например, группы из семи цитокинов (IFN $\gamma$ , IL-5, IL-6, IL-10, Flt-3L, фракталкина и GM-KCФ), повышение которых, вызванное лечением, может хорошо коррелировать как с опухолевой нагрузкой до лечения, так и с симптомами sCRS. Известны другие рекомендации по диагностике и лечению CRS (см., например, Lee et al, Blood. 2014; 124(2):188-95). В некоторых вариантах осуществления критерии, отражающие степень CRS, подробно описаны в **Таблице 2** ниже.

<b>Таблица 2: Примерные критерии оценки степени CRS</b>	
<b>Степень</b>	<b>Описание симптомов</b>
1 Легкая	Нет угрозы для жизни, требует лишь симптоматического лечения, такого как жаропонижающие средства и противорвотные средства (например, повышенная температура, тошнота, усталость, головная боль, миалгии, недомогание)
2 Средняя	Требует и отвечает на умеренное вмешательство: Потребность в кислороде <40%, или Гипотензия, чувствительная к жидкостям или низкой дозе одного вазопрессорного средства, или Степень 2 органотоксического действия (СТСАЕ v4.0)
3 Тяжелая	Требует и отвечает на интенсивное вмешательство: Потребность в кислороде $\geq$ 40%, или Гипотензия, требующая высокой дозы одного вазопрессорного средства (например, норэпинефрина $\geq$ 20 мкг/кг/мин, допамина $\geq$ 10 мкг/кг/мин, фенилэфрина $\geq$ 200 мкг/кг/мин или эпинефрина $\geq$ 10 мкг/кг/мин), или Гипотензия, требующая нескольких вазопрессорных средств (например, вазопрессин+одно из вышеуказанных средств или комбинация вазопрессорных средств, эквивалентная $\geq$ 20

	мкг/кг/мин норэпинефрина), или Степень 3 органотоксического действия или Степень 4 трансамината (СТСАЕ v4.0)
4 Угрожающая жизни	Угроза жизни: Требует поддержки дыхания ИВЛ, или Степень 4 органотоксического действия (исключая трансаминит)
5 Летальная	Смерть

[0632] В некоторых вариантах осуществления считают, что у субъекта развивается "тяжелый CRS" ("sCRS") в ответ на введение или после введения клеточной терапии или дозы клеток, если после введения у субъекта появляется: (1) повышенная температура не ниже 38 градусов Цельсия в течение не менее трех дней; (2) повышение цитокинов, которое включает одно из следующего: (а) максимальное кратное изменение не менее чем в 75 раз по меньшей мере двух из следующей группы из семи цитокинов по сравнению с уровнем непосредственно после введения: интерферон-гамма (IFN $\gamma$ ), ГМ-КСФ, IL-6, IL-10, Flt-3L, фракталкин и IL-5, и/или (б) максимальное кратное изменение не менее чем в 250 раз по меньшей мере одного из следующей группы из семи цитокинов по сравнению с уровнем непосредственно после введения: интерферон-гамма (IFN $\gamma$ ), ГМ-КСФ, IL-6, IL-10, Flt-3L, фракталкин и IL-5; и (с) по меньшей мере одно клиническое проявление токсического действия, такое как гипотензия (требующая применения по меньшей мере одного внутривенного вазоактивного сосудосуживающего средства) или гипоксия (PO<sub>2</sub><90%), или одно или несколько неврологических нарушений (включая изменения психического состояния, спутанность сознания и/или судороги). В некоторых вариантах осуществления тяжелый CRS включает в себя CRS с оценкой 3 балла или выше, как указано в **Таблице 2**.

[0633] В некоторых вариантах осуществления последствия, связанные с тяжелым CRS или CRS степени 3 или выше, например, степени 4 или выше, включают одно или более следующего: стойкое повышение температуры, например, повышение температуры до определенного значения, например выше чем или выше чем приблизительно 38 градусов Цельсия, в течение двух или более, например трех или более, например четырех или более дней или в течение по меньшей мере трех дней подряд; повышение температуры, выше чем или выше чем приблизительно 38 градусов Цельсия; повышение цитокинов, такое как максимальное кратное изменение, например, по меньшей мере в 75 или приблизительно в 75 раз, по сравнению с уровнями до лечения, по меньшей мере двух цитокинов (например, по меньшей мере двух из группы, состоящей из интерферона (IFN $\gamma$ ), ГМ-КСФ, IL-6, IL-10, Flt-3L, фракталкина и IL-5 и/или фактора некроза опухоли альфа (ФНО $\alpha$ )), или максимальное кратное изменение, например, по меньшей мере в 250 или приблизительно в 250 раз по меньшей мере одного из таких цитокинов; и/или по меньшей мере одно клиническое проявление токсического действия, такое как гипотензия (например, при измерено по меньшей мере с одним внутривенным вазоактивным сосудосуживающим средством); гипоксия (например, уровни кислорода в плазме крови

( $PO_2$ ) ниже чем или ниже чем приблизительно 90%); и/или одно или более неврологических нарушений (включая изменения психического состояния, спутанность сознания и судороги). В некоторых вариантах осуществления тяжелый CRS включает CRS, требующий наблюдения или лечения в палате интенсивной терапии (ПИТ).

[0634] В некоторых вариантах осуществления CRS, такой как тяжелый CRS, охватывает комбинацию: (1) стойкого повышения температуры (температура по меньшей мере 38 градусов Цельсия в течение по меньшей мере трех дней) и (2) уровень CRP в сыворотке по меньшей мере или приблизительно 20 мг/дл. В некоторых вариантах осуществления CRS включает гипотензию, требующую применения двух или более вазопрессорных средств, или нарушение дыхания, требующее искусственной вентиляции легких. В некоторых вариантах осуществления дозу вазопрессорных средств повышают при втором или последующем введении.

[0635] В некоторых вариантах осуществления тяжелый CRS или CRS 3 степени включает повышение аланинаминотрансферазы, повышение аспартатаминотрансферазы, озноб, фебрильную нейтропению, головную боль, дисфункцию левого желудочка, энцефалопатию, гидроцефалию и/или тремор.

[0636] Способ измерения или обнаружения различных последствий может быть определен.

[0637] В некоторых аспектах последствие токсического действия является или связано с нейротоксичностью. В некоторых вариантах осуществления симптомы, связанные с клиническим риском нейротоксичности, включают дезориентацию, делирий, экспрессивную афазию, спутанность сознания, миоклонию, летаргию, изменения психического состояния, конвульсии, судорожную активность, судороги (необязательно с подтверждением электроэнцефалограммой [ЭЭГ]), повышенные уровни бета-амилоида (A $\beta$ ), повышенные уровни глутамата и повышенные уровни кислородных радикалов. В некоторых вариантах осуществления нейротоксичность классифицируют по тяжести (например, при использовании шкалы из 1-5 пунктов (см., например, Guido Cavaletti & Paola Marmiroli Nature Reviews Neurology 6, 657-666 (December 2010); National Cancer Institute-Common Toxicity Criteria version 4.03 (NCI-CTCAE v4.03))).

[0638] В некоторых случаях неврологические симптомы могут быть ранними симптомами sCRS. В некоторых вариантах осуществления неврологические симптомы по наблюдениям начинаются через 5-7 дней после инфузии клеточной терапии. В некоторых вариантах осуществления длительность неврологических изменений может варьировать от 3 до 19 дней. В некоторых случаях устранение неврологических изменений происходит после разрешения других симптомов sCRS. В некоторых вариантах осуществления, время или степень разрешения неврологических изменений не ускоряется при лечении средствами против IL-6 и/или стероидом(ами).

[0639] В некоторых вариантах осуществления считают, что у субъекта развивается "тяжелая нейротоксичность" в ответ или после введения клеточной терапии или дозы клеток, если после введения у субъекта проявляются симптомы, ограничивающие

способность к самообслуживанию (например, купание, одевание и раздевание, прием пищи, использование туалета, прием лекарств), включающие следующее: 1) симптомы периферической моторной невропатии, включающие воспаление или дегенерацию периферических двигательных нервов; 2) симптомы периферической сенсорной невропатии, включающие воспаление или дегенерацию периферических сенсорных нервов, дизестезию, такую как нарушение сенсорного восприятия, приводящее к ненормальному и неприятному ощущению, невралгия, такая как интенсивное болевое ощущение по ходу нерва или группы нервов, и/или парестезия, такая как функциональные нарушения сенсорных нейронов, приводящие к ненормальным ощущениям покалывания кожи, онемения, давления, холода и тепла в отсутствие стимула. В некоторых вариантах осуществления тяжелая нейротоксичность включает нейротоксичность 3 степени или выше, как указано в **Таблице 3**.

Таблица 3: Примерные критерии оценки степени нейротоксичности

<b>Таблица 3: Примерные критерии оценки степени нейротоксичности</b>	
<b>Степень</b>	<b>Описание симптомов</b>
1 Асимптоматическая или легкая	Легкие симптомы или бессимптомное течение
2 Средняя	Наличие симптомов, ограничивающих инструментальную активность повседневной жизни (ADL), такую как приготовление пищи, совершение покупок продуктов или одежды, пользование телефоном, контроль финансов
3 Тяжелая	Наличие симптомов, которые ограничивают способность к самообслуживанию ADL, такому как купание, одевание и раздевание, самостоятельный прием пищи, пользование туалетом, прием лекарств
4 Угрожающая жизни	Симптомы, которые угрожают жизни и требуют неотложного вмешательства
5 Летальная	Смерть

[0640] В некоторых вариантах осуществления способы уменьшают симптомы, связанные с CRS или нейротоксичностью, по сравнению с другими способами. В некоторых аспектах предложенные способы уменьшают симптомы, последствия или факторы, связанные с CRS, включая симптомы, последствия или факторы, связанные с тяжелым CRS или CRS степени 3 или выше, по сравнению с другими способами. Например, субъекты, подвергнутые лечению согласно настоящим способам, могут не иметь поддающихся обнаружению симптомов и/или могут иметь уменьшенные симптомы, последствия или факторы CRS, например, тяжелого CRS или CRS степени 3 или выше, такие как любые описанные, например, представленные в **Таблице 2**. В некоторых вариантах осуществления субъекты, подвергнутые лечению согласно настоящим способам, могут иметь уменьшенные симптомы нейротоксичности, такие как слабость или онемение конечностей, потеря памяти, зрения и/или рассудка, неконтролируемое обсессивное и/или компульсивное поведение, бред, головную боль,

когнитивные и поведенческие расстройства, включая потерю контроля моторики, нарушение когнитивных функций и дисфункцию вегетативной нервной системы и нарушение половой функции, по сравнению с субъектами, подвергнутыми лечению другими способами. В некоторых вариантах осуществления субъекты, подвергнутые лечению согласно настоящим способам, могут иметь уменьшенные симптомы, связанные с периферической моторной невропатией, периферической сенсорной невропатией, дизестезией, невралгией или парестезией.

[0641] В некоторых вариантах осуществления введение клеток, полученных предложенными способами, уменьшает последствия, связанные с нейротоксичностью, включающие поражения нервной системы и/или головного мозга, такие как гибель нейронов. В некоторых аспектах способы снижают уровень факторов, связанных с нейротоксичностью, таких как бета-амилоид (A $\beta$ ), глутамат и кислородные радикалы.

[0642] В некоторых вариантах осуществления одно или более вмешательств или средств для лечения токсического действия, таких как терапии против токсического действия, вводят в момент, в который или сразу после которого у субъекта определяют или подтверждают (например, впервые определяют или подтверждают) проявление стойкого повышения температуры, например, при измерении в соответствии с любым из вышеуказанных вариантов осуществления. В некоторых вариантах осуществления одну или более терапий против токсического действия вводят в течение определенного периода времени такого подтверждения или определения, например, в течение 30 минут, 1 часа, 2 часов, 3 часов, 4 часов, 6 часов или 8 часов.

#### IV. ИЗДЕЛИЯ

[0643] Также предложены изделия и наборы, содержащие модифицированные клетки, экспрессирующие рекомбинантный рецептор, полученные способами, предложенными в настоящем документе, такими как способы, описанные в Разделе I, и/или готовые композиции клеток, описанные в Разделе I-F, и, необязательно, инструкции по применению, например, инструкции по введению модифицированных клеток субъекту, например, способами, описанными в Разделе III.

[0644] В некоторых вариантах осуществления в настоящем документе предложены изделия и/или наборы, которые включают композицию, содержащую терапевтически эффективное количество любых из модифицированных клеток, описанных в настоящем документе, и инструкции по введению субъекту для лечения заболевания или состояния. В некоторых вариантах осуществления в инструкциях могут быть указаны некоторые или все элементы способов введения клеток, которые предложены в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления инструкции определяют конкретные инструкции по введению клеток для клеточной терапии, например, дозы, время, подбор и/или идентификацию субъектов для введения и условия введения. В некоторых вариантах осуществления изделия и/или наборы дополнительно включают средство для лимфодеплеционной терапии и, необязательно, дополнительно включают инструкции по применению лимфодеплеционной терапии. В некоторых вариантах осуществления

инструкции могут быть включены в виде этикетки или вкладыша в упаковку, прилагаемого к композициям для введения.

[0645] В некоторых вариантах осуществления изделие может содержать контейнер, необязательно флакон, содержащий композицию обогащенных CD4+ Т-клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор. В некоторых вариантах осуществления изделие или набор необязательно включают второй контейнер, необязательно второй флакон, содержащий композицию обогащенных CD8+ Т-клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор. В некоторых вариантах осуществления криопротектор включают вместе с клетками. В некоторых аспектах контейнер представляет собой флакон или мешок. В некоторых вариантах осуществления контейнер содержит композицию обогащенных CD4+ и CD8+ Т-клеток.

[0646] В некоторых вариантах осуществления композиция обогащенных CD4+ Т-клеток в контейнере включает по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99%, по меньшей мере 99,5%, по меньшей мере 99,9% или 100% или приблизительно 100% CD4+ Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления композиция в контейнере включает по меньшей мере 30%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99%, по меньшей мере 99,5%, по меньшей мере 99,9% или 100% или приблизительно 100% CD4+ Т-клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор и/или трансдуцированных или трансфицированных рекомбинантным полинуклеотидом. В некоторых вариантах осуществления композиции обогащенных CD4+ Т-клеток в контейнере включают меньше 40%, меньше 35%, меньше 30%, меньше 25%, меньше 20%, меньше 15%, меньше 10%, меньше 5%, меньше 1%, меньше 0,1% или меньше 0,01% CD8+ Т-клеток, и/или не содержит CD8+ Т-клетки, и/или не содержит или по существу не содержит CD8+ Т-клетки.

[0647] В некоторых вариантах осуществления композиция обогащенных CD8+ Т-клеток в контейнере включает по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99%, по меньшей мере 99,5%, по меньшей мере 99,9% или 100% или приблизительно 100% CD8+ Т-клеток. В конкретных вариантах осуществления композиция в контейнере содержит по меньшей мере 30%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99%, по меньшей мере 99,5%, по меньшей мере 99,9% или 100% или приблизительно 100% CD8+ Т-клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор и/или трансдуцированных или трансфицированных рекомбинантным полинуклеотидом. В некоторых вариантах

осуществления готовая композиция обогащенных CD8+ Т-клеток, которую вводят субъекту, включает меньше 40%, меньше 35%, меньше 30%, меньше 25%, меньше 20%, меньше 15%, меньше 10%, меньше 5%, меньше 1%, меньше 0,1% или меньше 0,01% CD4+ Т-клеток, и/или не содержит CD4+ Т-клетки, и/или не содержит или по существу не содержит CD4+ Т-клетки.

[0648] В некоторых вариантах осуществления инструкции определяют дозу клеток, которую будут вводить. Например, в некоторых вариантах осуществления доза, определенная в инструкциях, включает суммарные экспрессирующие рекомбинантный рецептор (например, CAR) клетки в количестве от приблизительно  $1 \times 10^6$  до  $3 \times 10^8$ , например, в пределах от приблизительно  $1 \times 10^7$  до  $2 \times 10^8$  таких клеток, например,  $1 \times 10^7$ ,  $5 \times 10^7$ ,  $1 \times 10^8$  или  $1,5 \times 10^8$  всех таких клеток или диапазон между любыми двумя из предыдущих значений. В некоторых вариантах осуществления пациенту вводят многократные дозы, при этом каждая из доз или суммарная доза может находиться в пределах любого из предыдущих значений.

[0649] В некоторых вариантах осуществления контейнер, такой как флакон, включает больше чем или больше чем приблизительно  $10 \times 10^6$  Т-клеток или экспрессирующих рекомбинантный рецептор Т-клеток, больше чем или больше чем приблизительно  $15 \times 10^6$  Т-клеток или экспрессирующих рекомбинантный рецептор Т-клеток, больше чем или больше чем приблизительно  $25 \times 10^6$  Т-клеток или экспрессирующих рекомбинантный рецептор Т-клеток. В некоторых аспектах флакон включает от приблизительно 10 миллионов клеток на мл до приблизительно 70 миллионов клеток на мл, от приблизительно 10 миллионов клеток на мл до приблизительно 50 миллионов клеток на мл, от приблизительно 10 миллионов клеток на мл до приблизительно 25 миллионов клеток на мл, от приблизительно 10 миллионов клеток на мл до приблизительно 15 миллионов клеток на мл, от 15 миллионов клеток на мл до приблизительно 70 миллионов клеток на мл, от приблизительно 15 миллионов клеток на мл до приблизительно 50 миллионов клеток на мл, от приблизительно 15 миллионов клеток на мл до приблизительно 25 миллионов клеток на мл, от приблизительно 25 миллионов клеток на мл до приблизительно 70 миллионов клеток на мл, от приблизительно 25 миллионов клеток на мл до приблизительно 50 миллионов клеток на мл и от приблизительно 50 миллионов клеток на мл до приблизительно 70 миллионов клеток на мл.

[0650] В некоторых вариантах осуществления множество флаконов или множество клеток или единичная доза клеток, определенных для введения, в совокупности включают дозу клеток, включающую от  $1 \times 10^5$  до  $5 \times 10^8$  или от приблизительно  $1 \times 10^5$  до приблизительно  $5 \times 10^8$  суммарных экспрессирующих рекомбинантный рецептор Т-клеток или суммарных Т-клеток, от  $1 \times 10^5$  до  $1 \times 10^8$  или от приблизительно  $1 \times 10^5$  до приблизительно  $1 \times 10^8$  суммарных экспрессирующих рекомбинантный рецептор Т-клеток или суммарных Т-клеток, от  $5 \times 10^5$  до  $1 \times 10^7$  или от приблизительно  $5 \times 10^5$  до приблизительно  $1 \times 10^7$  суммарных экспрессирующих рекомбинантный рецептор Т-клеток

или суммарных Т-клеток или от  $1 \times 10^6$  до  $1 \times 10^7$  или от приблизительно  $1 \times 10^6$  до приблизительно  $1 \times 10^7$  суммарных экспрессирующих рекомбинантный рецептор Т-клеток или суммарных Т-клеток, все включительно. В некоторых аспектах изделие включает одну или более единичных доз CD4+ и CD8+ Т-клеток или CD4+рецептор+ Т-клеток и CD8+рецептор+ Т-клеток, где единичная доза включает от или от приблизительно  $1 \times 10^7$  до или до приблизительно  $2 \times 10^8$  экспрессирующих рекомбинантный рецептор Т-клеток, от или от приблизительно  $5 \times 10^7$  до или до приблизительно  $1,5 \times 10^8$  экспрессирующих рекомбинантный рецептор Т-клеток,  $5 \times 10^7$  или приблизительно  $5 \times 10^7$  экспрессирующих рекомбинантный рецептор Т-клеток,  $1 \times 10^8$  или приблизительно  $1 \times 10^8$  экспрессирующих рекомбинантный рецептор Т-клеток или  $1,5 \times 10^8$  или приблизительно  $1,5 \times 10^8$  экспрессирующих рекомбинантный рецептор Т-клеток, где, необязательно, информация в изделии определяет порядок введения одной или множества единичных доз и/или объема, соответствующего такой одной или множеству единичных доз. В некоторых случаях изделие включает одну или более единичных доз CD8+ Т-клеток, где доза включает от или от приблизительно  $5 \times 10^6$  до или до приблизительно  $1 \times 10^8$  экспрессирующих рекомбинантный рецептор CD8+ Т-клеток, доза включает от или от приблизительно  $1 \times 10^7$  до или до приблизительно  $0,75 \times 10^8$  экспрессирующих рекомбинантный рецептор CD8+ Т-клеток, доза включает в или приблизительно  $2,5 \times 10^7$  экспрессирующих рекомбинантный рецептор CD8+ Т-клеток или доза включает  $5 \times 10^7$  или приблизительно  $5 \times 10^7$  экспрессирующих рекомбинантный рецептор CD8+ Т-клеток, или доза включает  $0,75 \times 10^8$  или приблизительно  $0,75 \times 10^8$  экспрессирующих рекомбинантный рецептор CD8+ Т-клеток, где, необязательно, информация в изделии определяет порядок введения одной или множества единичных доз и/или объема, соответствующего такой одной или множеству единичных доз. В некоторых вариантах осуществления клетки в изделии в совокупности включают дозу клеток, включающую не больше  $1 \times 10^8$  суммарных экспрессирующих рекомбинантный рецептор Т-клеток или суммарных Т-клеток, не больше  $1 \times 10^7$  суммарных экспрессирующих рекомбинантный рецептор Т-клеток или суммарных Т-клеток, не больше  $0,5 \times 10^7$  суммарных экспрессирующих рекомбинантный рецептор Т-клеток или суммарных Т-клеток, не больше  $1 \times 10^6$  суммарных экспрессирующих рекомбинантный рецептор Т-клеток или суммарных Т-клеток, не больше  $0,5 \times 10^6$  суммарных экспрессирующих рекомбинантный рецептор Т-клеток или суммарных Т-клеток.

[0651] В некоторых вариантах осуществления инструкции могут определять схему применения и график введения доз. Например, в некоторых вариантах осуществления инструкции могут определять введение субъекту множества доз, например двух или более доз, клеток. В некоторых вариантах осуществления инструкции определяют график введения множества доз, например, вторую дозу вводят приблизительно через 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 или 21 день после введения первой дозы; и/или величину дозировки в каждой дозе.

[0652] В некоторых вариантах осуществления изделие или набор включает



композицию обогащенных CD4+ Т-клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор, и инструкции по введению субъекту, имеющему заболевание или состояние, всей или части композиции обогащенных CD4+ Т-клеток, и дополнительному введению CD8+ Т-клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор. В некоторых вариантах осуществления инструкции определяют введение CD4+ Т-клеток до введения CD8+ Т-клеток. В некоторых случаях инструкции определяют введение CD8+ Т-клеток до введения CD4+ Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления изделие или набор включает множество CD8+ Т-клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор, и инструкции по введению субъекту, имеющему заболевание или состояние, всего или части множества CD8+ Т-клеток и CD4+ Т-клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор. В некоторых вариантах осуществления инструкции определяют схему применения и график введения клеток.

[0653] В некоторых аспектах инструкции определяют введение всех или части CD4+ Т-клеток и всех или части CD8+ Т-клеток с интервалом от 0 до 12 часов, от 0 до 6 часов или от 0 до 2 часов. В некоторых случаях инструкции определяют введение CD4+ Т-клеток и CD8+ Т-клеток с интервалом не больше 2 часов, не больше 1 часа, не больше 30 минут, не больше 15 минут, не больше 10 минут или не больше 5 минут.

[0654] В некоторых вариантах осуществления инструкции определяют дозу или количество клеток, или тип(ы) клеток и/или отношение типов клеток, например, отдельных популяций или подтипов, такое как отношение CD4+ к CD8+. В некоторых вариантах осуществления популяции или подтипы клеток, такие как CD8+ и CD4+ Т-клетки. Например, в некоторых вариантах осуществления инструкции определяют, что клетки вводят в или в пределах переносимого диапазона или отношения на выходе множества популяций клеток или подтипов, таких как CD4+ и CD8+ Т-клетки или подтипы, составляющего от или от приблизительно 5:1 до или до приблизительно 5:1 (или больше чем приблизительно 1:5 и меньше чем приблизительно 5:1), или от или от приблизительно 1:3 до или до приблизительно 3:1 (или больше чем приблизительно 1:3 и меньше чем приблизительно 3:1), такого как от или от приблизительно 2:1 до или до приблизительно 1:5 (или больше чем приблизительно 1:5 и меньше чем приблизительно 2:1, такого как или приблизительно 5:1, 4,5:1, 4:1, 3,5:1, 3:1, 2,5:1, 2:1, 1,9:1, 1,8:1, 1,7:1, 1,6:1, 1,5:1, 1,4:1, 1,3:1, 1,2:1, 1,1:1, 1:1, 1:1,1, 1:1,2, 1:1,3, 1:1,4, 1:1,5, 1:1,6, 1:1,7, 1:1,8, 1:1,9: 1:2, 1:2,5, 1:3, 1:3,5, 1:4, 1:4,5 или 1:5. В некоторых вариантах осуществления инструкции определяют, что композиции обогащенных CD4+ Т-клеток и обогащенных CD8+ Т-клеток объединяют в требуемом соотношении и вводят субъекту в виде одной композиции клеток. В конкретных вариантах осуществления инструкции определяют, что композиции обогащенных CD4+ Т-клеток и обогащенных CD8+ Т-клеток вводят в виде отдельных композиций в требуемом отношении. В некоторых аспектах переносимое различие составляет приблизительно 1%, приблизительно 2%, приблизительно 3%, приблизительно 4% приблизительно 5%, приблизительно 10%, приблизительно 15%, приблизительно 20%, приблизительно 25%, приблизительно 30%, приблизительно 35%,

приблизительно 40%, приблизительно 45%, приблизительно 50% от требуемого отношения, включая любое значение между указанными диапазонами.

#### V. ОПРЕДЕЛЕНИЯ

[0655] Термины "полипептид" и "белок" используются попеременно для обозначения полимера из аминокислотных остатков и не ограничены минимальной длиной. Полипептиды, включая предложенные рецепторы и другие полипептиды, например, линкеры или пептиды, могут включать аминокислотные остатки, включая природные и/или неприродные аминокислотные остатки. Термины также включают постэкспрессионные модификации полипептида, например, гликозилирование, сиалирование, ацетилирование и фосфорилирование. В некоторых аспектах полипептиды могут содержать модификации по сравнению с нативной или природной последовательностью при условии, что белок сохраняет требуемую активность. Такие модификации могут быть введены преднамеренно, например, путем сайт-направленного мутагенеза, или могут быть случайными, например, в результате мутаций хозяев, которые продуцируют белки, или ошибок при ПЦР-амплификации.

[0656] При использовании в настоящем документе "субъект" является млекопитающим, таким как человек или другое животное, и обычно является человеком. В некоторых вариантах осуществления субъект, например пациент, которому вводят средство или средства, клетки, популяции или композиции клеток, является млекопитающим, обычно приматом, таким как человек. В некоторых вариантах осуществления приматом является обезьяна или человекообразная обезьяна. Субъект может быть мужского или женского пола и любого подходящего возраста, включая грудных детей, несовершеннолетних, подростков, взрослых и пожилых субъектов. В некоторых вариантах осуществления субъект является млекопитающим, не относящимся к примату, таким как грызун.

[0657] При использовании в настоящем документе "лечение" (и его грамматические вариации, такие как "лечить" или "лечащий") относится к полному или частичному облегчению или уменьшению заболевания или состояния, или нарушения, или симптома, нежелательному эффекту или исходу, или фенотипу, связанному с ним. Требуемые эффекты лечения включают, без ограничения перечисленными, предотвращение возникновения или рецидива заболевания, ослабление симптомов, уменьшение каких-либо прямых или непрямых патологических последствий заболевания, предотвращение метастазирования, уменьшение скорости прогрессирования заболевания, уменьшение тяжести или облегчение патологического состояния и ремиссию или улучшение прогноза. Термины не подразумевают полного излечения заболевания или полного устранения какого-либо симптома или воздействие на все симптомы или исходы.

[0658] При использовании в настоящем документе "задержка развития заболевания" означает отсрочку, препятствование, замедление, задерживание, стабилизацию, подавление и/или отложение развития заболевания (такого как рак). Эта задержка может иметь различную длительность, в зависимости от истории заболевания

и/или лица, проходящего лечение. В некоторых вариантах осуществления достаточная или значимая задержка может, в действительности, охватывать предупреждение, при которой у лица не развивается заболевание. Например, может быть задержано развитие рака на поздней стадии, такой как развитие метастазирования.

[0659] "Предупреждение" при использовании в настоящем документе включает обеспечение профилактики возникновения или рецидива заболевания у субъекта, который может быть предрасположен к заболеванию, но у которого заболевание еще не было диагностировано. В некоторых вариантах осуществления предложенные клетки и композиции применяются для задержки развития заболевания или замедления прогрессирования заболевания.

[0660] При использовании в настоящем документе "подавление" функции или активности означает уменьшение функции или активности по сравнению с такими же состояниями за исключением состояния или параметра, представляющего интерес, или, в альтернативе, по сравнению с другим состоянием. Например, клетки, которые подавляют рост опухоли, уменьшают скорость роста опухоли по сравнению со скоростью роста опухоли в отсутствие клеток.

[0661] "Эффективное количество" средства, например фармацевтического состава, клеток или композиции, в контексте введения, относится к эффективному количеству, в дозах/количествах и в течение периодов времени, требуемых для достижения требуемого результата, такого как терапевтический или профилактический результат.

[0662] "Терапевтически эффективное количество" средства, например, фармацевтической композиции или клеток, относится к количеству, эффективному в дозах и в течение периодов времени, необходимых для достижения требуемого терапевтического результата, например, для лечения заболевания, состояния или нарушения, и/или фармакокинетического или фармакодинамического эффекта лечения. Терапевтически эффективное количество может изменяться в зависимости от таких факторов, как патологическое состояние, возраст, пол и вес субъекта, а также популяций вводимых клеток. В некоторых вариантах осуществления предложенные способы включают введение клеток и/или композиций в эффективных количествах, например, терапевтически эффективных количествах.

[0663] "Профилактически эффективное количество" относится к эффективному количеству, в дозах и в течение периодов времени, необходимых для достижения требуемого профилактического результата. Как правило, но не обязательно, так как профилактическую дозу используют у субъектов до возникновения или на более ранней стадии заболевания, профилактически эффективное количество будет меньше, чем терапевтически эффективное количество. В контексте более низкой опухолевой нагрузки профилактически эффективное количество, в некоторых аспектах, будет выше, чем терапевтически эффективное количество.

[0664] Термин "приблизительно" при использовании в настоящем документе относится к обычному диапазону ошибок для соответствующего значения, который

известен специалисту в данной области техники. Ссылка на "приблизительно" значение или параметр в настоящем документе включает (и описывает) варианты осуществления, направленные на данное значение или параметр, как таковые.

[0665] При использовании в настоящем документе формы единственного числа ("a", "an" и "the") включают множественные ссылки, если из контекста явно не следует иное. Например, "a" или "an" означает "по меньшей мере один" или "один или более".

[0666] По всему тексту настоящего описания различные аспекты заявленного изобретения представлены в формате диапазона. Следует понимать, что описание в формате диапазона приведено лишь для удобства и краткости и не должно рассматриваться в качестве строгого ограничения объема заявленного изобретения. Таким образом, следует считать, что описание диапазона конкретно раскрывает все возможные поддиапазоны, а также отдельные числовые значения в этом диапазоне. Например, когда представлен диапазон значений, подразумевается, что каждое промежуточное значение между верхней и нижней границами этого диапазона и любым другим установленным или промежуточным значением в указанном диапазоне включено в заявленное изобретение. Верхняя и нижняя границы этих меньших диапазонов могут быть независимо включены в меньшие диапазоны и также охвачены заявленным изобретением с учетом любой прямо исключенной границы в указанном диапазоне. Если указанный диапазон включает одну или обе границы, диапазоны, исключаящие одну или обе из этих включенных границ, также включены в заявленное изобретение. Это применяется независимо от широты диапазона.

[0667] При использовании в настоящем документе композиция относится к любой смеси двух или более продуктов, веществ или соединений, включая клетки. Это может быть раствор, суспензия, жидкость, порошок, паста, водная, неводная, или их любая комбинация.

[0668] При использовании в настоящем документе "обогащение" в отношении одного или более конкретных типов клеток или популяции клеток относится к увеличению количества или процента типа или популяции клеток, например, по сравнению с общим количеством клеток в или в объеме композиции или относительно других типов клеток, например, в результате положительного отбора по маркерам, экспрессируемым популяцией или клеткой, или в результате отрицательного отбора по маркеру, не присутствующему на популяции клеток или клетке, подлежащей элиминированию. Термин не требует полного удаления других клеток, типов или популяций клеток из композиции и не требует, чтобы клетки, обогащенные таким образом, присутствовали на уровне или даже около 100% в обогащенной композиции.

[0669] При использовании в настоящем документе утверждение того, что клетка или популяция клеток является "положительной" на конкретный маркер, относится к обнаружимому присутствию на или в клетке конкретного маркера, как правило, поверхностного маркера. При указании поверхностного маркера, данный термин относится к присутствию поверхностной экспрессии, обнаруживаемой с помощью

проточной цитометрии, например, при окрашивании антителом, которое специфично связывается с маркером, и обнаружении указанного антитела, где окрашивание детектируют с помощью проточной цитометрии на уровне, существенно превышающем окрашивание, детектируемое при выполнении такой же процедуры с изотипически совпадающим контролем или гейтированным контролем флуоресценции минус один (FMO) в идентичных по остальным параметрам условиях, и/или на уровне, по существу аналогичном таковому для клетки, которая, как известно, является положительной на маркер, и/или на уровне, существенно превышающем уровень для клетки, которая, как известно, является отрицательной на маркер.

[0670] При использовании в настоящем документе утверждение того, что клетка или популяция клеток является "отрицательной" на конкретный маркер, относится к отсутствию существенного поддающегося обнаружению присутствия на или в клетке конкретного маркера, как правило, поверхностного маркера. При указании поверхностного маркера, данный термин относится к отсутствию поверхностной экспрессии, обнаруживаемой с помощью проточной цитометрии, например, при окрашивании антителом, которое специфично связывается с маркером, и обнаружении указанного антитела, где окрашивание не детектируют с помощью проточной цитометрии на уровне, существенно превышающем уровень окрашивания, детектируемый при выполнении такой же процедуры с изотипически совпадающим контролем или гейтированным контролем флуоресценции минус один (FMO) в идентичных по остальным параметрам условиям, и/или на уровне, по существу ниже, чем для клетки, которая, как известно, была положительной на маркер, и/или на уровне, по существу аналогичном по сравнению с клеткой, которая, как известно, была отрицательной на маркер.

[0671] Термин "вектор" при использовании в настоящем документе относится к молекуле нуклеиновой кислоты, способной к воспроизведению другой нуклеиновой кислоты, с которой она соединена. Термин включает вектор в качестве самореплицирующейся структуры нуклеиновой кислоты, а также вектор, включенный в геном клетки-хозяина, в которую он был введен. Некоторые векторы способны направлять экспрессию нуклеиновых кислот, с которыми они функционально связаны. Такие векторы именуется в настоящем документе как "векторы экспрессии".

## VI. ПРИМЕРНЫЕ ВАРИАНТЫ ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ

[0672] Предложенные варианты осуществления включают следующие:

1. Способ получения композиции модифицированных клеток, включающий:

(а) инкубирование при стимулирующих условиях исходной композиции, включающей Т-клетки, обогащенные CD4<sup>+</sup> первичными человеческими Т-клетками, где указанные стимулирующие условия включают присутствие: (i) стимулирующего реагента, способного к активации одного или более внутриклеточных сигнальных доменов одного или более компонентов комплекса TCR и/или одного или более внутриклеточных сигнальных доменов одной или более костимулирующих молекул, и (ii) одного или более

цитокинов, где по меньшей мере один цитокин представляет собой или включает рекомбинантный человеческий IL-2, с получением, таким образом, стимулированной композиции; и

(b) введение рекомбинантного рецептора в стимулированную композицию с получением, таким образом, модифицированной композиции, включающей модифицированные Т-клетки.

2. Способ согласно варианту осуществления 1, где:

исходная композиция включает больше чем или больше чем приблизительно 70%, больше чем или больше чем приблизительно 75%, больше чем или больше чем приблизительно 80%, больше чем или больше чем приблизительно 85%, больше чем или больше чем приблизительно 90%, больше чем или больше чем приблизительно 95% или больше чем или больше чем приблизительно 98% CD4+ первичных человеческих Т-клеток; и/или

исходная композиция состоит по существу из CD4+ первичных человеческих Т-клеток.

3. Способ согласно варианту осуществления 1 или варианту осуществления 2, где концентрация рекомбинантного IL-2 составляет от 10 МЕ/мл до 200 МЕ/мл или от приблизительно 10 МЕ/мл до приблизительно 200 МЕ/мл.

4. Способ согласно любому из вариантов осуществления 1-3, где один или более цитокинов дополнительно включают IL-7 и/или IL-15, где, необязательно, концентрация IL-7 составляет от 100 МЕ/мл до 1000 МЕ/мл или от приблизительно 100 МЕ/мл до приблизительно 1000 МЕ/мл, и/или концентрация IL-15 составляет от 1 МЕ/мл до 50 МЕ/мл или от приблизительно 1 МЕ/мл до приблизительно 50 МЕ/мл.

5. Способ согласно любому из вариантов осуществления 1-4, где инкубирование проводят в присутствии одного или более антиоксидантов.

6. Способ получения композиции модифицированных клеток, включающий:

(a) инкубирование исходной композиции, включающей Т-клетки, обогащенные CD4+ и/или CD8+ первичными человеческими Т-клетками, с получением, таким образом, стимулированной композиции, где инкубирование проводят:

(1) при одном или более стимулирующих условиях, где указанные стимулирующие условия включают присутствие: (i) стимулирующего реагента, способного к активации одного или более внутриклеточных сигнальных доменов одного или более компонентов комплекса TCR и/или одного или более внутриклеточных сигнальных доменов одной или более костимулирующих молекул и (ii) одного или более цитокинов; и/или

(2) в присутствии одного или более антиоксидантов; и

(b) введение рекомбинантного рецептора в стимулированную композицию, с получением, таким образом, модифицированной композиции, включающей модифицированные Т-клетки.

7. Способ согласно варианту осуществления 6, где:

исходная композиция включает больше чем или больше чем приблизительно 70%,

больше чем или больше чем приблизительно 75%, больше чем или больше чем приблизительно 80%, больше чем или больше чем приблизительно 85%, больше чем или больше чем приблизительно 90%, больше чем или больше чем приблизительно 95% или больше чем или больше чем приблизительно 98% CD4+ и/или CD8+ первичных человеческих Т-клеток; и/или

исходная композиция состоит по существу из CD4+ и/или CD8+ первичных человеческих Т-клеток.

8. Способ согласно варианту осуществления 6 или варианту осуществления 7, где один или более цитокинов выбраны из рекомбинантного IL-2, рекомбинантного IL-7 и/или рекомбинантного IL-15.

9. Способ согласно варианту осуществления 8, где:

концентрация рекомбинантного IL-2 составляет от 10 МЕ/мл до 200 МЕ/мл или от приблизительно 10 МЕ/мл до приблизительно 200 МЕ/мл;

концентрация рекомбинантного IL-7 составляет от 100 МЕ/мл до 1000 МЕ/мл или от приблизительно 100 МЕ/мл до приблизительно 1000 МЕ/мл; и/или

концентрация рекомбинантного IL-15 составляет от 1 МЕ/мл до 25 МЕ/мл или от приблизительно 1 МЕ/мл до приблизительно 25 МЕ/мл.

10. Способ согласно варианту осуществления 6, где:

исходная композиция включает больше чем приблизительно 70%, больше чем или больше чем приблизительно 75%, больше чем или больше чем приблизительно 80%, больше чем или больше чем приблизительно 85%, больше чем или больше чем приблизительно 90%, больше чем или больше чем приблизительно 95% или больше чем или больше чем приблизительно 98% CD4+ первичных человеческих Т-клеток; и/или

исходная композиция состоит по существу из CD4+ первичных человеческих Т-клеток.

11. Способ согласно варианту осуществления 6 или варианту осуществления 10, где один или более цитокинов выбраны из рекомбинантного IL-2, рекомбинантного IL-7 и рекомбинантного IL-15.

12. Способ согласно варианту осуществления 6, где:

исходная композиция включает больше чем приблизительно 70%, больше чем или больше чем приблизительно 75%, больше чем или больше чем приблизительно 80%, больше чем или больше чем приблизительно 85%, больше чем или больше чем приблизительно 90%, больше чем или больше чем приблизительно 95% или больше чем или больше чем приблизительно 98% CD8+ первичных человеческих Т-клеток; и/или

исходная композиция состоит по существу из CD8+ первичных человеческих Т-клеток.

13. Способ согласно варианту осуществления 6 или варианту осуществления 12, где один или более цитокинов выбраны из рекомбинантного IL-2 и рекомбинантного IL-15.

14. Способ согласно любому из вариантов осуществления 1-13, где

стимулирующий реагент включает основное средство, которое специфично связывается с членом комплекса TCR, которое, необязательно, специфично связывается с CD3.

15. Способ согласно варианту осуществления 14, где стимулирующий реагент дополнительно включает дополнительное средство, которое специфично связывается с Т-клеточной костимулирующей молекулой, где, необязательно, костимулирующая молекула выбрана из CD28, CD137 (4-1-BB), OX40 или ICOS.

16. Способ согласно варианту осуществления 14 или варианту осуществления 15, где основное и/или дополнительное средства включают антитело, где, необязательно, стимулирующий реагент включает инкубирование с антителом против CD3 и антителом против CD28 или их антигенсвязывающим фрагментом.

17. Способ согласно любому из вариантов осуществления 14-16, где основное средство и/или дополнительное средство присутствует на поверхности твердой подложки.

18. Способ согласно варианту осуществления 17, где твердая подложка представляет собой или включает сферу.

19. Способ согласно варианту осуществления 18, где сфера включает диаметр больше чем или больше чем приблизительно 3,5 мкм, но не больше чем приблизительно 9 мкм или не больше чем приблизительно 8 мкм, или не больше чем приблизительно 7 мкм, или не больше чем приблизительно 6 мкм, или не больше чем приблизительно 5 мкм.

20. Способ согласно варианту осуществления 18 или варианту осуществления 19, где сфера включает диаметр 4,5 мкм или приблизительно 4,5 мкм.

21. Способ согласно любому из вариантов осуществления 18-20, где сфера является инертной.

22. Способ согласно любому из вариантов осуществления 18-21, где сфера представляет собой или включает полистирольную поверхность.

23. Способ согласно любому из вариантов осуществления 18-22, где сфера является магнитной или суперпарамагнитной.

24. Способ согласно любому из вариантов осуществления 18-23, где отношение сфер к клеткам составляет меньше 3:1.

25. Способ согласно любому из вариантов осуществления 18-24, где отношение сфер к клеткам составляет от 2:1 до 0,5:1 или от приблизительно 2:1 до приблизительно 0,5:1.

26. Способ согласно любому из вариантов осуществления 18-25, где отношение сфер к клеткам составляет 1:1 или приблизительно 1:1.

27. Способ согласно любому из вариантов осуществления 5-26, где один или более антиоксидантов включают серосодержащий антиоксидант.

28. Способ согласно любому из вариантов осуществления 5-27, где один или более антиоксидантов включают предшественник глутатиона.

29. Способ согласно любому из вариантов осуществления 5-28, где один или более антиоксидантов включает N-ацетилцистеин (NAC), где, необязательно, NAC присутствует в концентрации от 0,2 мг/мл до 2,0 мг/мл или от приблизительно 0,2 мг/мл до



приблизительно 2,0 мг/мл.

30. Способ согласно любому из вариантов осуществления 1-29, где введение включает трансдукцию клеток стимулированной композиции вирусным вектором, включающим полинуклеотид, кодирующий рекомбинантный рецептор.

31. Способ согласно варианту осуществления 30, где вирусный вектор является ретровирусным вектором.

32. Способ согласно варианту осуществления 30 или варианту осуществления 31, где вирусный вектор является лентивирусным вектором или гаммаретровирусным вектором.

33. Способ согласно любому из вариантов осуществления 30-32, где введение производят в присутствии вещества, способствующего трансдукции.

34. Способ согласно варианту осуществления 33, где вещество, способствующее трансдукции, представляет собой или включает протамина сульфат, необязательно от 1 мкг/мл до 50 мкг/мл или от приблизительно 1 мкг/мл до приблизительно 50 мкг/мл протамина сульфата; производное фибронектина, способствующее трансдукции; и/или RetroNectin.

35. Способ согласно любому из вариантов осуществления 1-34, где введение включает трансфекцию клеток стимулированной композиции вектором, включающим полинуклеотид, кодирующий рекомбинантный рецептор.

36. Способ согласно варианту осуществления 35, где вектор является транспозоном, необязательно транспозоном Sleeping Beauty (SB) или транспозоном Piggybac.

37. Способ согласно любому из вариантов осуществления 1-36, дополнительно включающий культивирование модифицированной композиции в условиях, вызывающих пролиферацию или размножение модифицированных клеток, с получением, таким образом, готовой композиции, включающей модифицированные Т-клетки.

38. Способ согласно варианту осуществления 37, где культивирование производят в присутствии одного или более цитокинов, где по меньшей мере один цитокин представляет собой или включает рекомбинантный человеческий IL-2.

39. Способ согласно варианту осуществления 37 или варианту осуществления 38, где стимулирующий реагент удаляют из модифицированной композиции перед культивированием.

40. Способ согласно варианту осуществления 39, где стимулирующее средство удаляют через или через меньше чем 7 дней после начала инкубирования.

41. Способ согласно варианту осуществления 39 или варианту осуществления 40, где стимулирующий реагент удаляют от 3 дней до 6 дней или от приблизительно 3 дней до приблизительно 6 дней после начала инкубирования.

42. Способ согласно любому из вариантов осуществления 37-41, где стимулирующий реагент удаляют через или через приблизительно 4 дня после начала инкубирования.

43. Способ согласно любому из вариантов осуществления 39-42, где удаление сфер включает воздействие на клетки модифицированной композиции магнитного поля.

44. Способ получения композиции модифицированных клеток, включающий культивирование в присутствии одного или более цитокинов композиции модифицированных клеток, включающей CD4+ первичные человеческие Т-клетки, включающие клетки, модифицированные рекомбинантным рецептором, где по меньшей мере один цитокин представляет собой или включает рекомбинантный человеческий IL-2;

где способ приводит к пролиферации или экспансии клеток в композиции с получением готовой композиции, включающей модифицированные CD4+ клетки.

45. Способ согласно варианту осуществления 44, где пролиферация или размножение приводят к, приблизительно или по меньшей мере к 2-кратному, 3-кратному, 4-кратному, 5-кратному, или больше чем 5-кратному увеличению количества CD4+ Т-клеток, модифицированных рекомбинантным рецептором.

46. Способ согласно варианту осуществления 44 или 45, где:

композиция модифицированных клеток включает больше чем приблизительно 70%, больше чем или больше чем приблизительно 75%, больше чем или больше чем приблизительно 80%, больше чем или больше чем приблизительно 85%, больше чем или больше чем приблизительно 90%, больше чем или больше чем приблизительно 95% или больше чем или больше чем приблизительно 98% CD4+ первичных человеческих Т-клеток или CD4+ клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор; и/или

композиция модифицированных клеток состоит по существу из CD4+ первичных человеческих Т-клеток.

47. Способ согласно любому из вариантов осуществления 44-46, где концентрация рекомбинантного IL-2 составляет от 50 МЕ/мл до 500 МЕ/мл или от приблизительно 50 МЕ/мл до приблизительно 500 МЕ/мл.

48. Способ согласно любому из вариантов осуществления 38-47, где один или более цитокинов дополнительно включает IL-7 и/или IL-15, где, необязательно, концентрация IL-7 составляет от 500 МЕ/мл до 2000 МЕ/мл или от приблизительно 500 МЕ/мл до приблизительно 2000 МЕ/мл, и/или концентрация IL-15 составляет от 5 МЕ/мл до 50 МЕ/мл или от приблизительно 5 МЕ/мл до приблизительно 50 МЕ/мл.

49. Способ согласно любому из вариантов осуществления 44-48, где композицию модифицированных клеток получают способом, включающим:

(а) инкубирование при стимулирующих условиях исходной композиции, включающей первичные Т-клетки, обогащенные CD4+ первичными человеческими Т-клетками, где указанные стимулирующие условия включают присутствие: (i) стимулирующего реагента, способного к активации одного или более внутриклеточных сигнальных доменов одного или более компонентов комплекса TCR и/или одного или более внутриклеточных сигнальных доменов одной или более костимулирующих молекул, и (ii) одного или более цитокинов, где по меньшей мере один цитокин представляет собой или включает рекомбинантный человеческий IL-2, с получением,

таким образом, стимулированной композиции; и

(b) введение рекомбинантного рецептора в стимулированную композицию с получением, таким образом, модифицированной композиции, включающей модифицированные Т-клетки.

50. Способ согласно варианту осуществления 49, где:

исходная композиция включает больше чем или больше чем приблизительно 70%, больше чем или больше чем приблизительно 75%, больше чем или больше чем приблизительно 80%, больше чем или больше чем приблизительно 85%, больше чем или больше чем приблизительно 90%, больше чем или больше чем приблизительно 95% или больше чем или больше чем приблизительно 98% CD4+ первичных человеческих Т-клеток; и/или

исходная композиция состоит по существу из CD4+ первичных человеческих Т-клеток.

51. Способ согласно варианту осуществления 49 или варианту осуществления 50, где один или более цитокинов дополнительно включают IL-7 и/или IL-15.

52. Способ согласно любому из вариантов осуществления 37-51, где культивирование производят в присутствии поверхностно-активного вещества.

53. Способ согласно любому из вариантов осуществления 37-52, где по меньшей мере часть культивирования производят при непрерывном перемешивании и/или перфузии.

54. Способ получения композиции модифицированных клеток, включающий культивирование в присутствии одного или более цитокинов композиции модифицированных клеток, включающей CD4+ и/или CD8+ первичные человеческие Т-клетки, включающие клетки, модифицированные рекомбинантным рецептором, где культивирование производят в присутствии поверхностно-активного вещества, и/или по меньшей мере часть культивирования производят при непрерывном перемешивании и/или перфузии;

где способ приводит к пролиферации или экспансии клеток в композиции с получением готовой композиции, включающей модифицированные CD4+ и/или CD8+ Т-клетки.

55. Способ согласно варианту осуществления 48, где:

композиция модифицированных клеток включает больше чем или больше чем приблизительно 70%, больше чем или больше чем приблизительно 75%, больше чем или больше чем приблизительно 80%, больше чем или больше чем приблизительно 85%, больше чем или больше чем приблизительно 90%, больше чем или больше чем приблизительно 95% или больше чем или больше чем приблизительно 98% CD4+ и/или CD8+ первичных человеческих Т-клеток или CD4+ и/или CD8+ первичных Т-клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор; и/или

композиция модифицированных клеток состоит по существу из CD4+ и/или CD8+ первичных человеческих Т-клеток.

56. Способ согласно варианту осуществления 48, где пролиферация или размножение приводят к, приблизительно или по меньшей мере к 2-кратному, 3-кратному, 4-кратному, 5-кратному, или больше чем 5-кратному увеличению количества CD4+ и/или CD8+ Т-клеток, модифицированных рекомбинантным рецептором.

57. Способ согласно варианту осуществления 55, где один или более цитокинов выбраны из рекомбинантного IL-2, рекомбинантного IL-7 и/или рекомбинантного IL-15.

58. Способ согласно варианту осуществления 56 или варианту осуществления 57, где:

концентрация рекомбинантного IL-2 составляет от 50 МЕ/мл до 500 МЕ/мл или от приблизительно 50 МЕ/мл до приблизительно 500 МЕ/мл;

концентрация рекомбинантного IL-7 составляет от 500 МЕ/мл до 2000 МЕ/мл или от приблизительно 500 МЕ/мл до приблизительно 2000 МЕ/мл; и/или

концентрация рекомбинантного IL-15 составляет от 5 МЕ/мл к 50 МЕ/мл или от приблизительно 5 МЕ/мл до приблизительно 50 МЕ/мл.

59. Способ согласно варианту осуществления 54, где:

композиция модифицированных клеток включает больше чем приблизительно 70%, больше чем или больше чем приблизительно 75%, больше чем или больше чем приблизительно 80%, больше чем или больше чем приблизительно 85%, больше чем или больше чем приблизительно 90%, больше чем или больше чем приблизительно 95% или больше чем или больше чем приблизительно 98% CD4+ первичных человеческих Т-клеток или CD4+ первичных человеческих Т-клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор; и/или

композиция модифицированных клеток состоит по существу из CD4+ первичных человеческих Т-клеток.

60. Способ согласно варианту осуществления 59, где пролиферация или экспансия приводят к, приблизительно или по меньшей мере к 2-кратному, 3-кратному, 4-кратному, 5-кратному, или больше чем 5-кратному увеличению количества CD8+ Т-клеток, модифицированных рекомбинантным рецептором.

61. Способ согласно варианту осуществления 54 или варианту осуществления 55, где один или более цитокинов выбраны из рекомбинантного IL-2, рекомбинантного IL-7 и рекомбинантного IL-15.

62. Способ согласно варианту осуществления 54, где:

композиция модифицированных клеток включает больше чем приблизительно 70%, больше чем или больше чем приблизительно 75%, больше чем или больше чем приблизительно 80%, больше чем или больше чем приблизительно 85%, больше чем или больше чем приблизительно 90%, больше чем или больше чем приблизительно 95% или больше чем или больше чем приблизительно 98% CD8+ первичных человеческих Т-клеток или CD8+ первичных человеческих Т-клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор; и/или

композиция модифицированных клеток состоит по существу из CD8+ первичных

человеческих Т-клеток.

63. Способ согласно варианту осуществления 54 или варианту осуществления 62, где один или более цитокинов выбраны из рекомбинантного IL-2 и рекомбинантного IL-15.

64. Способ согласно любому из вариантов осуществления 52-63, где поверхностно-активное вещество включает полоксамер, где, необязательно, полоксамер присутствует в концентрации от 0,5 мкл/мл до 5 мкл/мл или от приблизительно 0,5 мкл/мл до приблизительно 5 мкл/мл.

65. Способ согласно варианту осуществления 64, где полоксамер представляет собой Полоксамер 188.

66. Способ согласно любому из вариантов осуществления 54-65, где композицию модифицированных клеток получают способом, включающим:

(a) инкубирование при стимулирующих условиях исходной композиции, включающей первичные Т-клетки, обогащенные CD4<sup>+</sup> и/или CD8<sup>+</sup> первичными человеческими Т-клетками, где указанные стимулирующие условия включают присутствие: (i) стимулирующего реагента, способного к активации одного или более внутриклеточных сигнальных доменов одного или более компонентов комплекса TCR и/или одного или более внутриклеточных сигнальных доменов одной или более костимулирующих молекул, и (ii) одного или более цитокинов с получением, таким образом, стимулированной композиции; и

(b) введение рекомбинантного рецептора в стимулированную композицию с получением, таким образом, модифицированной композиции, включающей модифицированные Т-клетки.

67. Способ согласно варианту осуществления 66, где:

исходная композиция включает больше чем или больше чем приблизительно 70%, больше чем или больше чем приблизительно 75%, больше чем или больше чем приблизительно 80%, больше чем или больше чем приблизительно 85%, больше чем или больше чем приблизительно 90%, больше чем или больше чем приблизительно 95% или больше чем или больше чем приблизительно 98% CD4<sup>+</sup> и/или CD8<sup>+</sup> первичных человеческих Т-клеток; и/или

исходная композиция состоит по существу из CD4<sup>+</sup> и/или CD8<sup>+</sup> первичных человеческих Т-клеток.

68. Способ согласно варианту осуществления 66 или варианту осуществления 67, где один или более цитокинов выбраны из рекомбинантного IL-2, рекомбинантного IL-7 и/или рекомбинантного IL-15.

69. Способ согласно варианту осуществления 66, где:

исходная композиция включает больше чем приблизительно 70%, больше чем или больше чем приблизительно 75%, больше чем или больше чем приблизительно 80%, больше чем или больше чем приблизительно 85%, больше чем или больше чем приблизительно 90%, больше чем или больше чем приблизительно 95% или больше чем

или больше чем приблизительно 98% CD4+ первичных человеческих Т-клеток; и/или исходная композиция состоит по существу из CD4+ первичных человеческих Т-клеток.

70. Способ согласно варианту осуществления 66 или варианту осуществления 69, где один или более цитокинов выбраны из рекомбинантного IL-2, рекомбинантного IL-7 и рекомбинантного IL-15.

71. Способ согласно варианту осуществления 66, где:

исходная композиция включает больше чем приблизительно 70%, больше чем или больше чем приблизительно 75%, больше чем или больше чем приблизительно 80%, больше чем или больше чем приблизительно 85%, больше чем или больше чем приблизительно 90%, больше чем или больше чем приблизительно 95% или больше чем или больше чем приблизительно 98% CD8+ первичных человеческих Т-клеток; и/или исходная композиция состоит по существу из CD8+ первичных человеческих Т-клеток.

72. Способ согласно варианту осуществления 66 или варианту осуществления 71, где один или более цитокинов выбраны из рекомбинантного IL-2 и рекомбинантного IL-15.

73. Способ согласно любому из вариантов осуществления 49-53 и 66-72, где стимулирующий реагент включает основное средство, которое специфично связывается с членом комплекса TCR, которое, необязательно, специфично связывается с CD3.

74. Способ согласно варианту осуществления 73, где стимулирующий реагент дополнительно включает дополнительное средство, которое специфично связывается с Т-клеточной костимулирующей молекулой, где, необязательно, костимулирующая молекула выбрана из CD28, CD137 (4-1-BB), OX40 или ICOS.

75. Способ согласно варианту осуществления 73 или варианту осуществления 74, где основное и/или дополнительное средства включают антитело, где, необязательно, стимулирующий реагент включает инкубирование с антителом против CD3 и антителом против CD28 или их антигенсвязывающим фрагментом.

76. Способ согласно любому из вариантов осуществления 73-75, где основное средство и/или дополнительное средство присутствует на поверхности твердой подложки.

77. Способ согласно варианту осуществления 76, где твердая подложка представляет собой или включает сферу.

78. Способ согласно варианту осуществления 77, где сфера включает диаметр больше чем или больше чем приблизительно 3,5 мкм, но не больше чем приблизительно 9 мкм или не больше чем приблизительно 8 мкм, или не больше чем приблизительно 7 мкм, или не больше чем приблизительно 6 мкм, или не больше чем приблизительно 5 мкм.

79. Способ согласно варианту осуществления 77 или варианту осуществления 78, где сфера включает диаметр 4,5 мкм или приблизительно 4,5 мкм.

80. Способ согласно любому из вариантов осуществления 77-79, где сфера является инертной.

81. Способ согласно любому из вариантов осуществления 77-80, где сфера представляет собой или включает полистирольную поверхность.

82. Способ согласно любому из вариантов осуществления 77-81, где сфера является магнитной или суперпарамагнитной.

83. Способ согласно любому из вариантов осуществления 77-82, где отношение сфер к клеткам составляет меньше 3:1.

84. Способ согласно любому из вариантов осуществления 77-83, где отношение сфер к клеткам составляет от 2:1 до 0,5:1 или от приблизительно 2:1 до приблизительно 0,5:1.

85. Способ согласно любому из вариантов осуществления 77-84, где отношение сфер к клеткам составляет 1:1 или приблизительно 1:1.

86. Способ согласно любому из вариантов осуществления 49-53 и 66-85, где инкубирование производят в присутствии одного или более антиоксидантов.

87. Способ согласно варианту осуществления 86, где один или более антиоксидантов включают серосодержащий антиоксидант.

88. Способ согласно варианту осуществления 86 или варианту осуществления 87, где один или более антиоксидантов включают предшественник глутатиона.

89. Способ согласно любому из вариантов осуществления 86-88, где один или более антиоксидантов включают N-ацетилцистеин (NAC), где, необязательно, NAC присутствует в концентрации от 0,2 мг/мл до 2,0 мг/мл или от приблизительно 0,2 мг/мл до приблизительно 2,0 мг/мл.

90. Способ согласно любому из вариантов осуществления 49-53 и 66-89, где введение включает трансдукцию клеток стимулированной композиции вирусным вектором, включающим полинуклеотид, кодирующий рекомбинантный рецептор.

91. Способ согласно варианту осуществления 90, где вирусный вектор является ретровирусным вектором.

92. Способ согласно варианту осуществления 90 или варианту осуществления 91, где вирусный вектор является лентивирусным вектором или гаммаретровирусным вектором.

93. Способ согласно любому из вариантов осуществления 49-53 и 66-92, где введение производят в присутствии вещества, способствующего трансдукции.

94. Способ согласно варианту осуществления 93, где вещество, способствующее трансдукции, представляет собой или включает протамина сульфат, необязательно от 1 мкг/мл до 50 мкг/мл или от приблизительно 1 мкг/мл до приблизительно 50 мкг/мл протамина сульфата; производное фибронектина, способствующее трансдукции; и/или RetroNectin.

95. Способ согласно любому из вариантов осуществления 49-53 и 66-89, где введение включает трансфекцию клеток стимулированной композиции вектором, включающим полинуклеотид, кодирующий рекомбинантный рецептор.

96. Способ согласно варианту осуществления 95, где вектор является

транспозоном, необязательно транспозоном Sleeping Beauty (SB) или транспозоном Piggybac.

97. Способ согласно любому из вариантов осуществления 44-69, где композиция модифицированных клеток не включает стимулирующий реагент, и/или стимулирующий реагент был по существу удален из композиции перед культивированием, где указанный стимулирующий реагент включает реагент, способный к активации одного или более внутриклеточных сигнальных доменов одного или более компонентов комплекса TCR и/или одного или более внутриклеточных сигнальных доменов одной или более костимулирующих молекул.

98. Способ согласно любому из вариантов осуществления 37-97, где культивирование проводят по меньшей мере до тех пор, пока готовая композиция не будет содержать пороговое количество Т-клеток.

99. Способ согласно варианту осуществления 98, где культивирование продолжают в течение по меньшей мере одного дня после того, как достигнуто пороговое количество Т-клеток.

100. Способ согласно варианту осуществления 98 или варианту осуществления 99, где пороговое количество является по меньшей мере в 2 раза, по меньшей мере в 3 раза, по меньшей мере в 4 раза, по меньшей мере в 5 или более раз больше, чем количество в модифицированной композиции клеток до культивирования.

101. Способ согласно любому из вариантов осуществления 37-100, где культивирование проводят в течение от 2 дней до 10 дней включительно, и/или культивирование проводят в течение по меньшей мере 10 дней.

102. Способ согласно любому из вариантов осуществления 37-101, где после культивирования собирают клетки готовой композиции.

103. Способ согласно варианту осуществления 102, где промежуток времени между началом инкубирования и сбором клеток готовой композиции составляет от 7 дней до 15 дней или от приблизительно 7 дней до приблизительно 15 дней.

104. Способ согласно варианту осуществления 102 или варианту осуществления 102, где промежуток времени между началом инкубирования и сбором клеток готовой композиции составляет от 9 дней до 13 дней или от приблизительно 9 дней до приблизительно 13 дней.

105. Способ согласно любому из вариантов осуществления 102-104, где промежуток времени между началом инкубирования и сбором клеток готовой композиции составляет от 8 дней до 13 дней или от приблизительно 8 дней до приблизительно 13 дней.

106. Способ согласно любому из вариантов осуществления 37-105, дополнительно включающий включение клеток готовой композиции в состав для криоконсервации и/или введения субъекту, необязательно в присутствии фармацевтически приемлемого вспомогательного вещества.

107. Способ согласно варианту осуществления 106, где клетки готовой композиции включают в состав в присутствии криопротектора.



108. Способ согласно варианту осуществления 107, где криопротектор включает ДМСО.

109. Способ согласно любому из вариантов осуществления 106-108, где клетки готовой композиции помещают в контейнер, необязательно флакон или пакет.

110. Способ согласно любому из вариантов осуществления 1-43 и 49-53 и 66-89, дополнительно включающий выделение CD4<sup>+</sup> и/или CD8<sup>+</sup> Т-клеток из биологического образца перед инкубированием.

111. Способ согласно варианту осуществления 110, где выделение включает отбор клеток на основе поверхностной экспрессии CD4 и/или CD8, необязательно путем положительного или отрицательного отбора.

112. Способ согласно варианту осуществления 110 или варианту осуществления 111, где выделение включает проведение иммуноаффинного отбора.

113. Способ согласно любому из вариантов осуществления 110-112, где биологический образец включает первичные Т-клетки, полученные у субъекта.

114. Способ согласно варианту осуществления 113, где субъектом является человек.

115. Способ согласно любому из вариантов осуществления 110-112, где биологический образец представляет собой или включает образец цельной крови, образец лейкоцитомоноцитарного слоя, образец мононуклеарных клеток периферической крови (МКПК), нефракционированный образец Т-клеток, образец лимфоцитов, образец лейкоцитов, продукт афереза или продукт лейкофереза.

116. Способ согласно любому из вариантов осуществления 1-115, где рекомбинантный рецептор способен связываться с антигеном-мишенью, который ассоциирован с, является специфическим для и/или экспрессируется на клетке или ткани заболевания, нарушения или состояния.

117. Способ согласно варианту осуществления 116, где заболевание, нарушение или состояние является инфекционным заболеванием или нарушением, аутоиммунным заболеванием, воспалительным заболеванием или опухолью или раком.

118. Способ согласно варианту осуществления 116 или 117, где антиген-мишень является опухолевым антигеном.

119. Способ согласно любому из вариантов осуществления 116-118, где антиген-мишень выбран из 5Т4, 8Н9, интегрина avb6, В7-Н6, антигена созревания В-клеток (BCMA), СА9, раково-тестикулярного антигена, карбоангидразы 9 (CAIX), CCL-1, CD19, CD20, CD22, РЭА, поверхностного антигена гепатита В, CD23, CD24, CD30, CD33, CD38, CD44, CD44v6, CD44v7/8, CD123, CD138, CD171, раково-эмбрионального антигена (РЭА), СЕ7, циклина, циклина А2, с-Met, двойного антигена, EGFR, эпителиального гликопротеина 2 (EPG-2), эпителиального гликопротеина 40 (EPG-40), ЕРНa2, эфрина В2, erb-B2, erb-B3, erb-B4, димеров erbB, EGFR vIII, эстрогенового рецептора, фетального AchR, рецептора фолата альфа, фолат-связывающего белка (FBP), FCRL5, FCRH5, фетального рецептора ацетилхолина, G250/CAIX, GD2, GD3, gp100, сопряженного с G-

белком рецептора 5D (GPCR5D), Her2/neu (рецепторной тирозинкиназы erbB2), HMW-MAA, IL-22R-альфа, рецептора IL-13 альфа-2 (IL-13Ra2), рецептора с доменом вставки киназы (kdr), легкой цепи каппа, Льюис Y, молекулы клеточной адгезии L1 (L1-CAM), меланома-ассоциированного антигена (MAGE)-A1, MAGE-A3, MAGE-A6, MART-1, мезотелина, мышинового CMV, муцина 1 (MUC1), MUC16, NCAM, NKG2D, лигандов NKG2D, NY-ESO-1, O-ацетилированного GD2 (OGD2), онкофетального антигена, предпочтительно экспрессируемого антигена меланомы (PRAME), PSCA, прогестеронового рецептора, сурвивина, ROR1, TAG72, tEGFR, рецепторов VEGF, VEGF-R2, белка опухоли Вильмса 1 (WT-1), патогенспецифического антигена и антигена, ассоциированного с универсальной меткой.

120. Способ согласно любому из вариантов осуществления 1-119, где рекомбинантный рецептор представляет собой или включает функциональный не-TCR антигенный рецептор или TCR или его антигенсвязывающий фрагмент.

121. Способ согласно любому из вариантов осуществления 1-120, где рекомбинантный рецептор является химерным антигенным рецептором (CAR).

122. Способ согласно любому из вариантов осуществления 1-121, где рекомбинантный рецептор представляет собой CAR против CD19.

123. Способ согласно варианту осуществления 121, где химерный антигенный рецептор включает внеклеточный домен, включающий антигенсвязывающий домен.

124. Способ согласно варианту осуществления 123, где антигенсвязывающий домен представляет собой или включает антитело или фрагмент антитела, который необязательно является одноцепочечным фрагментом.

125. Способ согласно варианту осуществления 124, где фрагмент включает переменные области антитела, соединенные гибким линкером.

126. Способ согласно варианту осуществления 124 или варианту осуществления 125, где фрагмент включает scFv.

127. Способ согласно любому из вариантов осуществления 123-126, где химерный антигенный рецептор дополнительно включает спейсер и/или шарнирную область.

128. Способ согласно любому из вариантов осуществления 123-127, где химерный антигенный рецептор включает внутриклеточную сигнальную область.

129. Способ согласно варианту осуществления 128, где внутриклеточная сигнальная область включает внутриклеточный сигнальный домен.

130. Способ согласно варианту осуществления 129, где внутриклеточный сигнальный домен представляет собой или включает первичный сигнальный домен, сигнальный домен, который способен к индукции первичного сигнала активации в T-клетке, сигнальный домен компонента T-клеточного рецептора (TCR) и/или сигнальный домен, включающий иммунорецепторный тирозиновый активирующий мотив (ITAM).

131. Способ согласно варианту осуществления 130, где внутриклеточный сигнальный домен представляет собой или включает внутриклеточный сигнальный домен цепи CD3, необязательно CD3-дзета (CD3 $\zeta$ ) цепи или его сигнальную часть.

132. Способ согласно любому из вариантов осуществления 128-131, где химерный антигенный рецептор дополнительно включает трансмембранный домен, расположенный между внеклеточным доменом и внутриклеточной сигнальной областью.

133. Способ согласно любому из вариантов осуществления 128-132, где внутриклеточная сигнальная область дополнительно включает костимулирующую сигнальную область.

134. Способ согласно варианту осуществления 133, где костимулирующая сигнальная область включает внутриклеточный сигнальный домен Т-клеточной костимулирующей молекулы или его сигнальную часть.

135. Способ согласно варианту осуществления 133 или варианту осуществления 134, где костимулирующая сигнальная область включает внутриклеточный сигнальный домен CD28, 4-1BB или ICOS или их сигнальную часть.

136. Способ согласно любому из вариантов осуществления 133-135, где костимулирующая сигнальная область расположена между трансмембранным доменом и внутриклеточной сигнальной областью.

137. Способ согласно любому из вариантов осуществления 98-101, где готовую композицию, включающую пороговое количество или большее количество клеток, получают в результате больше чем или больше чем приблизительно 85%, больше чем или больше чем приблизительно 90% или больше чем или больше чем приблизительно 95% итераций способа.

138. Композиция, включающая модифицированные клетки, полученные способом согласно любому из вариантов осуществления 1-137.

139. Композиция согласно варианту осуществления 138, дополнительно включающая фармацевтически приемлемый носитель.

140. Композиция согласно варианту осуществления 138 или варианту осуществления 139, включающая криопротектор, необязательно ДМСО.

141. Изделие, включающее композицию согласно любому из вариантов осуществления 138-140 и инструкции по введению готовой композиции субъекту.

142. Изделие согласно варианту осуществления 141, где субъект имеет заболевание или состояние, где, необязательно, рекомбинантный рецептор специфично распознает или специфично связывается с антигеном, ассоциированным с или экспрессируемым или присутствующим на клетках, заболевания или состояния.

143. Изделие согласно варианту осуществления 141 или 142, где готовая композиция является композицией модифицированных CD4<sup>+</sup> Т-клеток.

144. Изделие согласно варианту осуществления 141 или 142, где готовая композиция является модифицированной композицией CD8<sup>+</sup> Т-клеток.

145. Изделие, включающее композицию модифицированных CD4<sup>+</sup> Т-клеток, полученную способом согласно любому из вариантов осуществления 1-11, 13-60, 63-70 или 72-137, композицию модифицированных CD8<sup>+</sup> Т-клеток, полученную способом согласно любому из вариантов осуществления 6-8, 11-43, 54-58, 60-68 или 70-137, и

инструкции по введению модифицированных CD4<sup>+</sup> Т-клеток и модифицированных CD8<sup>+</sup> Т-клеток субъекту.

146. Изделие согласно варианту осуществления 145, где инструкции предписывают отдельно вводить CD4<sup>+</sup> Т-клетки и CD8<sup>+</sup> Т-клетки субъекту.

147. Изделие согласно варианту осуществления 145 или 146, где инструкции предписывают вводить CD4<sup>+</sup> Т-клетки и CD8<sup>+</sup> Т-клетки субъекту в требуемом соотношении.

148. Способ согласно любому из вариантов осуществления 1-137, где способ проводят меньше чем за 21 день включительно.

## VII. ПРИМЕРЫ

[0673] Следующие примеры включены исключительно в иллюстративных целях и не предназначены для ограничения объема изобретения.

### **Пример 1: Способы создания терапевтических композиций CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> клеток, экспрессирующих CAR против CD19.**

[0674] Модифицированные CD4<sup>+</sup> Т-клетки и модифицированные CD8<sup>+</sup> Т-клетки, экспрессирующие один и тот же химерный антигенный рецептор (CAR) против CD19, получали в процессе, включающем обработку популяций обогащенных CD4<sup>+</sup> и обогащенных CD8<sup>+</sup> клеток по отдельности в этапах процесса. CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> клетки отдельно отбирали из человеческих мононуклеарных клеток периферической крови (МКПК), которые были получены при лейкоферезе, с получением отдельных композиций обогащенных CD4<sup>+</sup> и обогащенных CD8<sup>+</sup> клеток, которые затем подвергали криозаморозке. Затем композиции CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> размораживали и отдельно подвергали этапам стимуляции, трансдукции и экспансии.

[0675] Размороженные CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> клетки отдельно стимулировали в присутствии парамагнитных сфер с полистирольным покрытием, связанных с антителами против CD3 и против CD28, при отношении сфер к клеткам 1:1. Стимуляцию проводили в среде, содержащей человеческий рекомбинантный IL-2, человеческий рекомбинантный IL-15 и N-ацетилцистеин (NAC). Среда для CD4<sup>+</sup> клеток также содержала человеческий рекомбинантный IL-7.

[0676] После введения сфер, CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> клетки отдельно трансдуцировали лентивирусным вектором, кодирующим один и тот же CAR против CD19. CAR содержал scFv против CD19, полученный из мышиного антитела, иммуноглобулиновый спейсер, трансмембранный домен, полученный из CD28, костимулирующую область, полученную из 4-1BB, и внутриклеточный сигнальный домен CD3-дзета. Вектор также кодировал усеченный EGFR (EGFRt), который служил суррогатным маркером экспрессии CAR, который был связан с конструкцией CAR последовательностью T2A. Клетки трансдуцировали в присутствии 10 мкг/мл протамина сульфата.

[0677] После трансдукции сферы удаляли из композиций клеток при воздействии магнитного поля. Композиции CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> клеток затем отдельно культивировали для размножения при непрерывном перемешивании и переносе кислорода в биореакторе

(биореактор Xuri W25). В среды добавляли полоксамер. Обе композиции клеток культивировали в присутствии IL-2 и IL-15. Среды для CD4+ клеток также включали IL-7. Все CD4+ и CD8+ клетки культивировали, до сбора, до 4-кратной экспансии. Через один день после достижения порога, клетки из каждой композиции отдельно собирали, включали в состав и подвергали криозаморозке. Примерный процесс представлен в Таблице E1.

**Таблица E1: Описание примерного процесса создания CD4+ и CD8+ CAR-T клеток**

Стадия	CD4+ клетки	CD8+ клетки
<b>Стимуляция</b> (день 1-2)	сферы, конъюгированные с антителом против CD3/CD28 отношение сфер к клеткам 1:1 среды: IL-2, IL-7, IL-15 и NAC	сферы, конъюгированные с антителом против CD3/CD28 отношение сфер к клеткам 1:1 среды: IL-2, IL-15 и NAC
<b>Трансдукция</b> (день 2-5)	средство, способствующее трансдукции (например, 10 мкг/мл протамина сульфата)	средство, способствующее трансдукции (например, 10 мкг/мл протамина сульфата)
<b>Удаление сфер</b> (день 5*)	удаление магнитных сфер	удаление магнитных сфер
<b>Экспансия</b> (день 5* - сбор клеток)	биореактор с качанием и/или непрерывным перемешиванием среды: IL-2, IL-7, IL15 и полоксамер	биореактор с качанием и/или непрерывным перемешиванием среды: IL-2, IL-7, IL15 и полоксамер

\*Приблизительно

[0678] Примерный процесс, представленный в Таблице E1, сравнивали с примерным альтернативным процессом. Альтернативный процесс отличался следующим: NAC не добавляли к средам во время стимуляции; среды для CD4+ клеток не содержали IL-2; клетки стимулировали при отношении сфер к клеткам 3:1; клетки трансдуцировали с более высокой концентрацией протамина сульфата; удаление сфер производили приблизительно в день 7; и размножение проводили в статических условиях, т.е. без постоянного перемешивания или перфузии (например, полунепрерывной и/или поэтапной перфузии) и без полоксамера.

**Пример 2: Оценка длительности процесса создания терапевтических композиций CD4+ и CD8+ CAR-T-клеток.**

[0679] Оценивали различные признаки примерных и альтернативных процессов, описанных в Примере 1. В одном эксперименте циклы процессов проводили для примерных и альтернативных процессов с отдельными композициями CD4+ и CD8+ клеток, полученных из одного и того же образца лейкофереза ДВККЛ человека. Общее количество клеток измеряли в разных временных точках во время фаз стимуляции, трансдукции и экспансии каждого процесса. Как показано на ФИГ. 1, композиции CD4+ и CD8+ клеток, подвергнутые примерному процессу, размножались быстрее и достигали примерной степени экспансии (4-кратной экспансии), которую в этом исследовании нужно было достичь до сбора клеток, за более короткий промежуток времени, чем наблюдали в случае альтернативного процесса.

[0680] Длительность фаз экспансии (до 4-кратной экспансии в данном исследовании) примерного процесса в Примере 1 и альтернативного процесса оценивали в серии повторных циклов процессов отдельных композиций клеток CD4+ и CD8+, полученных из образцов лейкофереза, забранных у субъектов с ДВККЛ. Длительность этой фазы примерного процесса оценивали на основе серии примерных циклов с отдельными композициями CD4+ и CD8+ клеток, полученными из образцов лейкофереза, забранных у здоровых субъектов и субъектов с ДВККЛ. Длительность измеряли как промежуток времени от начала стимуляции до сбора клеток (который в этом примерном исследовании производили через один день после достижения четырехкратной экспансии). В этом исследовании наблюдали, что циклы примерного процесса имеют более короткую длительность от начала экспансии до 4-кратной экспансии или сбора клеток с более узким распределением (например, от 9 и 13 дней в одном исследовании) в различных циклах с этой продолжительностью по сравнению с продолжительностью альтернативного процесса.

[0681] Моделировали длительность примерных производственных протоколов с применением примерного и альтернативного процессов (примерный и альтернативный производственные протоколы, соответственно). В целом результаты моделирования совпадали с интерпретацией, что примерный процесс способен достигать сравнительно короткой длительности протокола с меньшей вариабельностью, чем другие производственные протоколы.

**Пример 3: Оценка процессов создания терапевтических композиций CD4+ и CD8+ CAR-T-клеток.**

[0682] Примерный набор композиций CD4+ и CD8+ клеток получали из образцов (включая образцы, которые в альтернативном процессе показали длительность фазы экспансии (экспансии до сбора клеток (4-кратной экспансии) больше 17 дней, и образцы, которые показали длительность фазы экспансии равную или меньше 17 дней), обрабатывали с применением примерного процесса. Суммарное количество клеток измеряли в различные временные точки во время фаз стимуляции, трансдукции и экспансии, пока не был достигнут порог сбора клеток.

[0683] Композиции CD4+ и CD8+ клеток, размножившиеся до 4-кратной экспансии, получали в примерном процессе из образцов композиций обоих типов (которые, как наблюдали, размножались до 4-кратной экспансии меньше чем за 17 дней или больше, и композиции, которые, как наблюдали, размножались больше чем за 17 дней, в другом процессе), с низким диапазоном вариабельности по длительности.

**Пример 4: Получение терапевтических композиций CD4+ и CD8+ CAR-T-клеток из биологического образца, полученного у субъекта с хроническим лимфолейкозом.**

[0684] Отдельные композиции CD4+ и CD8+ Т-клеток, отобранных из выделенных МКПК из образца лейкофереза человека, полученного у субъекта с хроническим лимфолейкозом (ХЛЛ), инкубировали, трансдуцировали и культивировали в примерном

процессе, описанном в Примере I. Были созданы отдельные композиции модифицированных CD4<sup>+</sup> Т-клеток и модифицированных CD8<sup>+</sup> Т-клеток, которые экспрессировали один и тот же CAR против CD19.

**Пример 5: Непрерывная поточная визуализация для определения жизнеспособности клеток во время культивирования.**

[0685] Различные оптические параметры Т-клеток в процессе модификации для экспрессии рекомбинантного рецептора получали с помощью поточной дифференциальной цифровой голографической микроскопии (ДНМ). Дифференциальная ДНМ позволяет производить визуализацию клеток без меток с получением высококонтрастных изображений для сегментации объекта и получения множества оптических или морфологических показателей, которые количественно описывают визуализируемые объекты, например, для определения количеств и жизнеспособности клеток.

[0686] Первичные Т-клетки здоровых человеческих доноров модифицировали для экспрессии химерного антигенного рецептора (CAR) против CD19 с применением примерного процесса модификации, в целом, как описано в Примерах 1 выше. Проводили два эксперимента: Эксперимент 1 с двумя экспериментальными циклами при использовании CD4<sup>+</sup> клеток от двух разных здоровых доноров (Донор 1 или Донор 2), и Эксперимент 2 с экспериментальным циклом для каждого из CD4<sup>+</sup> клеток и CD8<sup>+</sup> клеток от третьего донора (Донор 3). Клетки культивировали для экспансии при переносе в биореактор (например, качающийся биореактор). Культивирование включало замену сред с полунепрерывной перфузией и непрерывным перемешиванием.

[0687] Голографические изображения и оптические параметры клеток постоянно регистрировали в течение до приблизительно 120 часов культивирования при использовании поточной системы дифференциальной ("непрерывной") визуализации ДНМ, например Ovizio iLine F (Ovizio Imaging Systems NV/SA, Brussels, Belgium). Поточная дифференциальная система ДНМ содержала одноразовую систему трубок, подключенную к биореактору таким образом, что образец может вытекать из биореактора через систему трубок, где система визуализации регистрирует голографические изображения и оптические параметры проходящих клеток, и направляет образец обратно в биореактор. Жизнеспособность клеток и количество жизнеспособных клеток (VCC) определяли по изображениям. Жизнеспособность модифицированных клеток также сравнивали с результатами ручного отбора ("ручной") и подсчета клеток с помощью автоматизированного цитометра в пробах, отобранных в различные временные точки в течение до приблизительно 120 часов культивирования. Эти два способа сравнивали на основе анализа временной динамики и линейной регрессии.

[0688] На **ФИГ. 2А-2D** показано сравнение количества жизнеспособных клеток (VCC) и жизнеспособности, оцениваемых при использовании постоянного мониторинга с помощью дифференциальной ДНМ или ручного отбора, в CD4<sup>+</sup> клетках из Эксперимента 1 с Донором 1 (**ФИГ. 2А**), Эксперимента 1 с Донором 2 (**ФИГ. 2В**) или Эксперимента 2 с

Донором 3 (ФИГ. 2С), или CD8+ клетках из Эксперимента 2 с Донором 3 (ФИГ. 2D). R2 и наклон при сравнении показан в **Таблице E2** ниже.

[0689] **Таблица E2.** R2 и наклон при сравнении способов отбора.

Эксперимент	R <sup>2</sup>		наклон	
	VCC	Жизнеспособность	VCC	Жизнеспособность
Эксперимент 1, Донор 1, CD4+	0,98	0,99	1,29	1,02
Эксперимент 1, Донор 2, CD4+	0,98	1,00	1,49	1,01
Эксперимент 2, Донор 3, CD4+	0,71	0,92	1,11	0,98
Эксперимент 2, Донор 3, CD8+	0,99	0,99	1,49	0,95

[0690] Результаты показали, что VCC и жизнеспособность при непрерывном контроле и ручном отборе сильно совпадали для CD4+ и CD8+ клеток и клеток от разных доноров. Результаты согласовывались с применимостью постоянного мониторинга с помощью дифференциальной ДНМ в ходе культивирования для экспансии клеток в процессе модификации клеток.

**Пример 6: Сравнение ручной и автоматизированной экспансии с помощью непрерывной поточной визуализации.**

[0691] Полностью автоматизированный способ размножения клеток без участия операторов с непрерывным мониторингом клеток посредством поточной визуализации и автоматизированной перфузии сравнивали со способом ручного размножения.

[0692] Первичные Т-клетки здорового человека-донора активировали и трансдуцировали вектором для экспрессии примерного химерного антигенного рецептора (CAR) с применением примерного процесса модификации. После трансдукции клетки объединяли в пулы и инокулировали в две разных культуры, одну для автоматизированной экспансии на основе непрерывной поточной визуализации с помощью дифференциальной ДНМ и одну для способа ручной экспансии.

[0693] В культуре автоматизированной экспансии клетки культивируют в биореакторе с качанием и заменой сред при перфузии и непрерывном перемешивании. Жизнеспособность клеток и количество жизнеспособных клеток (VCC) контролировали с помощью автоматизированной системы визуализации дифференциальной ДНМ, в целом, как описано в Примере 5 выше. Начальное VCC на момент инокуляции было аналогичным для обеих культур ( $0,12 \times 10^6$  клеток для автоматизированной культуры,  $0,14 \times 10^6$  клеток для ручной культуры). Перфузия при автоматизированной экспансии была основана на четырехчасовом скользящем среднем VCC, вычисленном с использованием программного алгоритма, где среднее значение VCC, превышающее целевое VCC, было необходимо для последовательного выполнения способа. Целевое значение VCC составляло  $0,6 \times 10^6$  клеток/мл,  $1 \times 10^6$  клеток/мл и  $4 \times 10^6$  клеток/мл за 3 этапа перфузии. Никакого дополнительного участия оператора после инокуляции не было. В культуре ручной экспансии перфузию проводили на основе ручного отбора проб и оценки VCC при добавлении определенного объема сред, добавляемых после достижения



порогового значения VCC. Клетки также оценивали на экспрессию маркеров на клеточной поверхности с помощью проточной цитометрии.

[0694] Как показано на **ФИГ. 3**, более высокий рост Т-клеток наблюдали для автоматизированной системы экспансии. Жизнеспособность клеток при оценке с помощью непрерывной визуализации дифференциальной ДНМ и фенотипы клеток при оценке с помощью проточной цитометрии были аналогичными при сравнении автоматизированного и ручного процессов экспансии.

[0695] Результаты согласовывались с применимостью непрерывной визуализации ДНМ и автоматизированного процесса экспансии для культивирования и мониторинга клеток в ходе процесса модификации Т-клеток без необходимости в участии человека-оператора. В некоторых аспектах такой способ может применяться для определения кинетики роста первичных Т-клеток и определения времени сбора клеток для модификации или введения.

[0696] Объем настоящего изобретения не должен ограничиваться конкретными раскрытыми вариантами осуществления, которые предоставлены, например, для иллюстрации различных аспектов изобретения. Различные модификации описанных композиций и способов станут очевидными из описания и принципов, представленных в настоящем документе. Такие вариации могут быть осуществлены без отступления от истинного объема и сущности изобретения и предназначены для включения в объем настоящего изобретения.

#### ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ

SEQ ID NO.	ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ	ОПИСАНИЕ
1	ESKYGPPCPPCP	спейсер (IgG4шарнир)(ак) Homo sapiens
2	GAATCTAAGTACGGACCGCCCTGCCCCCTTGCCCT	спейсер (IgG4шарнир)(нт) homo sapiens
3	ESKYGPPCPPCPGQPREPQVYTLPPS QEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK	Шарнир-CH3 спейсер Homo sapiens
4	ESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS QEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK	Шарнир-CH2-CH3 спейсер Homo sapiens

<b>5</b>	RWPESPKAQASSVPTAQPPAEGSLAKATTAPATTRNTG RGGEKKKEKEKEEQEERETKTPECPSHTQPLGVYLLT PAVQDLWLRDKATFTCFVVGSDLKDAHLTWEVAGKV PTGGVEGLLERHSNGSQSQHSRLTLPRSLWNAGTSVT CTLNHPSLPPQRLMALREPAQAQAPVKLSLNLASSDPPE AASWLLCEVSGFSPPNILLMWLEDQREVNTSGFAPARP PPQPGSTTFWAWSVLRVPAPPSPQPATYTCVVSHEDSR TLLNASRSLEVS YVTDH	IgD-шарнир-Fc Homo sapiens
<b>6</b>	LEGGGEGRGSLLTCGDVEENPGPR	T2A искусственная
<b>7</b>	MLLLVTSLLLCELPHPAFLIPRKVCNGIGIGEFKDSL NATNIKHFKNCTISISGDLHILPVAFRGDSFTHTPPLDPQE LDILKTVKEITGFLLIQAWPENRTDLHAFENLEIIRGRTK QHGGQFSLAVVSLNITSLGLRSLKEISDGDVIISGNKNLCY ANTINWKKLFGTSGQKTKIISNRGENSCKATGQVCHAL CSPEGCWGPEPRDCVSCRNVSRGRECVDKCNLLEGEPR EFVENSECIQCHPECLPQAMNITCTGRGPDNCIQCAHYI DGPHCVKTCPAGVMGENNTLVWKYADAGHVCHLCHP NCTYGCTGPGLEGCPNTPGPKIPSIATGMV GALLLLLVV ALGIGLFM	tEGFR искусственная
<b>8</b>	FWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWV	CD28 (аминокислоты 153-179 из Рег. номер P10747) Homo sapiens
<b>9</b>	IEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPFPGPSKPF WVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWV	CD28 (аминокислоты 114-179 из Рег. номер P10747) Homo sapiens
<b>10</b>	RSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFA AYRS	CD28 (аминокислоты 180-220 P10747) Homo sapiens
<b>11</b>	RSKRSRGGHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFA AYRS	CD28 (LL→GG) Homo sapiens
<b>12</b>	KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEG GCEL	4-1BB (аминокислоты 214-255 из Q07011.1) Homo sapiens
<b>13</b>	RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDK RRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEI GMKGERRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALP PR	CD3-дзета Homo sapiens
<b>14</b>	RVKFSRSAEPPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDK RRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEI GMKGERRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALP PR	CD3-дзета Homo sapiens
<b>15</b>	RVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDK RRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEI GMKGERRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALP PR	CD3-дзета Homo sapiens

16	RKVCNGIGIGEFKDSLSINATNIKHFKNCTSISGDLHILP VAFRGDSFTHTPPLDPQELDILKTVKEITGFLLIQAWPEN RTDLHAFENLEIIRGRTKQHGQFSLAVVSLNITSLGLRSL KEISDGDVIISGNKNLCYANTINWKKLFGTSGQKTKIISN RGENSCKATGQVCHALCSPEGCWGPEPRDCVSCRNV RGRECVDKCNLLEGEPRFVENSECIQCHPECLPQAMNI TCTGRGPDNCIQCAHYIDGPHCVKTCAPAGVMGENNTL VWKYADAGHVCHLCHPNCTYGCTGPGLEGCPNGPKI PSIATGMV GALLLLLVVALGIGLFM	tEGFR искусственная
17	EGRGSLTTCGDVEENPGP	T2A искусственная
18	GSGATNFSLLKQAGDVEENPGP	P2A
19	ATNFSLLKQAGDVEENPGP	P2A
20	QCTNYALLKLAGDVESNPGP	E2A
21	VKQTLNFDLLKLAGDVESNPGP	F2A
22	PGGG-(SGGG)5-P-, где P - пролин, G - глицин, и S - серин	Примерный линкер
23	GSADDAKKDAAKKDGKS	Примерный линкер
24	GSTSGSGKPGSGEGSTKG	Примерный линкер
25	Glu Val Val Val Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro	Примерный IgG Шарнир
26	X1PPX2P X1 - глицин, цистеин или аргинин X2 - цистеин или треонин	Примерный IgG Шарнир
27	Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro	Примерный IgG Шарнир
28	Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro	Примерный IgG Шарнир
29	ELKTPLGDTHTCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPEPKSCDTPP PCPRCPEPKSCDTPPPCPRCP	Примерный IgG Шарнир
30	Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro	Примерный IgG Шарнир
31	Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro	Примерный IgG Шарнир
32	Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro	Примерный IgG Шарнир
33	Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro	Примерный IgG Шарнир
34	QQGNTLPYT	CDR L3
35	RASQDISKYLN	CDR L1
36	SRLHSGV	CDR L2
37	GNTLPYTFG	CDR L3
38	DYGV	CDR H1
39	VIWGSETTYNSALKS	CDR H2
40	YAMDYWG	CDR H3
41	EVKLQESGPLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIR QPPRKGLEWLGVIWGSETTYNSALKSRLLTIKDNSKSQ VFLKMNSLQTDDTAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQG TSVTVSS	VH

42	DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQQ KPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNL EQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGKLEIT	VL
43	DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQQ KPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNL EQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGKLEITGSTSGSGKPG SGEGSTKGEVKLQESGGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPD YGVSWIRQPPRKLEWLGVIWGSETTYNSALKSRLTII KDNSKSQVFLKMNSLQTDATAIYYCAKHYYYGGSYA MDYWGQGTSVTVSS	scFv
44	KASQNVGTNVA	CDR L1
45	SATYRNS	CDR L2
46	QQYNRYPYT	CDR L3
47	SYWMN	CDR H1
48	QIYPGDGDTNYNGKFKG	CDR H2
49	KTISSVDFYFDY	CDR H3
50	EVKLQQSGAELVRPGSSVKISCKASGYAFSSYWMNWV KQRPQGLEWIGQIYPGDGDTNYNGKFKGQATLTADK SSSTAYMQLSGLTSEDSAVYFCARKTISSVDFYFDYW GQGTTVTVSS	VH
51	DIELTQSPKFMSTSVGDRVSVTCKASQNVGTNVAWYQ QKPGQSPKPLIYSATYRNSGVPDRFTGSGSGTDFTLTIT NVQSKDLADYFCQQYNRYPYTSGGGTKLEIKR	VL
52	GGGGSGGGSGGGGS	Линкер
53	EVKLQQSGAELVRPGSSVKISCKASGYAFSSYWMNWV KQRPQGLEWIGQIYPGDGDTNYNGKFKGQATLTADK SSSTAYMQLSGLTSEDSAVYFCARKTISSVDFYFDYW GQGTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIELTQSPKFMST SVGDRVSVTCKASQNVGTNVAWYQQKPGQSPKPLIYS ATYRNSGVPDRFTGSGSGTDFTLTITNVQSKDLADYFC QQYNRYPYTSGGGTKLEIKR	scFv
54	HYYYGGSYAMDY	CDR H3
55	HTSRLHS	CDR L2
56	GSTSGSGKPGSGEGSTKG	Линкер
57	gacatccagatgaccagaccctccagcctgagcgcagcctgggagaccgggt gaccatcagctgccggccagccaggacatcagcaagtacctgaactggtatcagca gaagcccagcggcaccgtcaagctgctgatctaccacaccagccggctgcacagcgg cgtgccagccgggttagcggcagcggctccggcaccgactacagcctgaccatctcc aacctggaacaggaagatatgccacacttttgccagcagggcaacacactgccta cacccttggcggcggaaacaagctggaaatcaccggcagcactccggcagcggca agcctggcagcggcggagggcagcaccagggcgaggtgaagctgcaggaaagcg gacctggcctggtggccccagccagagcctgagcgtgacctgacctgagcggc gtgagcctgcccactacggcgtgagctggatccggcagccccaggaaggcct ggaatggctggcgtgatctggggcagcagaccactactacaacagcgcctgaa gagccggctgaccatcatcaaggacaacagcaagaccaggtgttctgaagatgaa cagcctgcagaccgacgacaccgccatctactactcgccaagcactactactacggc ggcagctacgccatggactactggggccagggcaccagcgtgacctgagcagc	Последовательность, кодирующая scFv
58	MPLLLLLPLLWAGALA	Сигнальный пептид CD33

<b>59</b>	MALPVTALLLPLALLHA	Сигнальный пептид CD8-альфа
<b>60</b>	atgcttctcctggtgacaagccttctgctctgtgagttaccacaccagcattcctcctgat ccca	Сигнальная последовательность альфа-цепи GMCSFR
<b>61</b>	MLLLVTSLLLCELPHPAFLIP	Сигнальная последовательность альфа-цепи GMCSFR

**ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ**

1. Способ получения композиции модифицированных клеток, включающий:

(а) инкубирование при стимулирующих условиях исходной композиции, включающей Т-клетки, обогащенные CD4+ первичными человеческими Т-клетками, где указанные стимулирующие условия включают присутствие: (i) стимулирующего реагента, способного к активации одного или более внутриклеточных сигнальных доменов одного или более компонентов комплекса TCR и/или одного или более внутриклеточных сигнальных доменов одной или более костимулирующих молекул, и (ii) одного или более цитокинов, где по меньшей мере один цитокин представляет собой или включает рекомбинантный человеческий IL-2, с получением, таким образом, стимулированной композиции; и

(b) введение рекомбинантного рецептора в стимулированную композицию с получением, таким образом, модифицированной композиции, включающей модифицированные Т-клетки.

2. Способ по п.1, где:

исходная композиция включает больше чем или больше чем приблизительно 70%, больше чем или больше чем приблизительно 75%, больше чем или больше чем приблизительно 80%, больше чем или больше чем приблизительно 85%, больше чем или больше чем приблизительно 90%, больше чем или больше чем приблизительно 95% или больше чем или больше чем приблизительно 98% CD4+ первичных человеческих Т-клеток; и/или

исходная композиция состоит по существу из CD4+ первичных человеческих Т-клеток.

3. Способ по п.1 или по п.2, где концентрация рекомбинантного IL-2 составляет от 10 МЕ/мл до 200 МЕ/мл или от приблизительно 10 МЕ/мл до приблизительно 200 МЕ/мл.

4. Способ по любому из пп.1-3, где один или более цитокинов дополнительно включают IL-7 и/или IL-15, где, необязательно, концентрация IL-7 составляет от 100 МЕ/мл до 1000 МЕ/мл или от приблизительно 100 МЕ/мл до приблизительно 1000 МЕ/мл, и/или концентрация IL-15 составляет от 1 МЕ/мл до 50 МЕ/мл или от приблизительно 1 МЕ/мл до приблизительно 50 МЕ/мл.

5. Способ по любому из пп.1-4, где инкубирование проводят в присутствии одного или более антиоксидантов.

6. Способ получения композиции модифицированных клеток, включающий:

(а) инкубирование исходной композиции, включающей Т-клетки, обогащенные CD4+ и/или CD8+ первичными человеческими Т-клетками, с получением, таким образом, стимулированной композиции, где инкубирование проводят:

(1) при одном или более стимулирующих условиях, где указанные стимулирующие условия включают присутствие: (i) стимулирующего реагента, способного к активации одного или более внутриклеточных сигнальных доменов одного или более компонентов комплекса TCR и/или одного или более внутриклеточных сигнальных доменов одной или

более костимулирующих молекул, и (ii) одного или более цитокинов; и/или

(2) в присутствии одного или более антиоксидантов; и

(b) введение рекомбинантного рецептора в стимулированную композицию с получением, таким образом, модифицированной композиции, включающей модифицированные Т-клетки.

7. Способ по п.6, где:

исходная композиция включает больше чем или больше чем приблизительно 70%, больше чем или больше чем приблизительно 75%, больше чем или больше чем приблизительно 80%, больше чем или больше чем приблизительно 85%, больше чем или больше чем приблизительно 90%, больше чем или больше чем приблизительно 95% или больше чем или больше чем приблизительно 98% CD4<sup>+</sup> и/или CD8<sup>+</sup> первичных человеческих Т-клеток; и/или

исходная композиция состоит по существу из CD4<sup>+</sup> и/или CD8<sup>+</sup> первичных человеческих Т-клеток.

8. Способ по п.6 или по п.7, где один или более цитокинов выбраны из рекомбинантного IL-2, рекомбинантного IL-7 и/или рекомбинантного IL-15.

9. Способ по п.8, где:

концентрация рекомбинантного IL-2 составляет от 10 МЕ/мл до 200 МЕ/мл или от приблизительно 10 МЕ/мл до приблизительно 200 МЕ/мл;

концентрация рекомбинантного IL-7 составляет от 100 МЕ/мл до 1000 МЕ/мл или от приблизительно 100 МЕ/мл до приблизительно 1000 МЕ/мл; и/или

концентрация рекомбинантного IL-15 составляет от 1 МЕ/мл до 25 МЕ/мл или от приблизительно 1 МЕ/мл до приблизительно 25 МЕ/мл.

10. Способ по п.6, где:

исходная композиция включает больше чем приблизительно 70%, больше чем или больше чем приблизительно 75%, больше чем или больше чем приблизительно 80%, больше чем или больше чем приблизительно 85%, больше чем или больше чем приблизительно 90%, больше чем или больше чем приблизительно 95% или больше чем или больше чем приблизительно 98% CD4<sup>+</sup> первичных человеческих Т-клеток; и/или

исходная композиция состоит по существу из CD4<sup>+</sup> первичных человеческих Т-клеток.

11. Способ по п.6 или по п.10, где один или более цитокинов выбраны из рекомбинантного IL-2, рекомбинантного IL-7 и рекомбинантного IL-15.

12. Способ по п.6, где:

исходная композиция включает больше чем приблизительно 70%, больше чем или больше чем приблизительно 75%, больше чем или больше чем приблизительно 80%, больше чем или больше чем приблизительно 85%, больше чем или больше чем приблизительно 90%, больше чем или больше чем приблизительно 95% или больше чем или больше чем приблизительно 98% CD8<sup>+</sup> первичных человеческих Т-клеток; и/или

исходная композиция состоит по существу из CD8<sup>+</sup> первичных человеческих Т-

клеток.

13. Способ по п.6 или по п.12, где один или более цитокинов выбраны из рекомбинантного IL-2 и рекомбинантного IL-15.

14. Способ по любому из пп.1-13, где стимулирующий реагент включает основное средство, которое специфично связывается с членом комплекса TCR, которое, необязательно, специфично связывается с CD3.

15. Способ по п.14, где стимулирующий реагент дополнительно включает дополнительное средство, которое специфично связывается с Т-клеточной костимулирующей молекулой, где, необязательно, костимулирующая молекула выбрана из CD28, CD137 (4-1-BB), OX40 или ICOS.

16. Способ по п.14 или по п.15, где основное и/или дополнительное средства включают антитело, где, необязательно, стимулирующий реагент включает инкубирование с антителом против CD3 и антителом против CD28 или их антигенсвязывающим фрагментом.

17. Способ по любому из пп.14-16, где основное средство и/или дополнительное средство присутствует на поверхности твердой подложки.

18. Способ по п.17, где твердая подложка представляет собой или включает сферу.

19. Способ по п.18, где сфера включает диаметр больше чем или больше чем приблизительно 3,5 мкм, но не больше чем приблизительно 9 мкм или не больше чем приблизительно 8 мкм, или не больше чем приблизительно 7 мкм, или не больше чем приблизительно 6 мкм, или не больше чем приблизительно 5 мкм.

20. Способ по п.18 или по п.19, где сфера включает диаметр 4,5 мкм или приблизительно 4,5 мкм.

21. Способ по любому из пп.18-20, где сфера является инертной.

22. Способ по любому из пп.18-21, где сфера представляет собой или включает полистирольную поверхность.

23. Способ по любому из пп.18-22, где сфера является магнитной или суперпарамагнитной.

24. Способ по любому из пп.18-23, где отношение сфер к клеткам составляет меньше чем или меньше чем приблизительно 3:1.

25. Способ по любому из пп.18-24, где отношение сфер к клеткам составляет от 2:1 до 0,5:1 или от приблизительно 2:1 до приблизительно 0,5:1.

26. Способ по любому из пп.18-25, где отношение сфер к клеткам составляет 1:1 или приблизительно 1:1.

27. Способ по любому из пп.5-26, где один или более антиоксидантов включают серосодержащий антиоксидант.

28. Способ по любому из пп.5-27, где один или более антиоксидантов включают предшественник глутатиона.

29. Способ по любому из пп.5-28, где один или более антиоксидантов включают N-ацетилцистеин (NAC), где, необязательно, NAC присутствует в концентрации от 0,2 мг/мл



до 2,0 мг/мл или от приблизительно 0,2 мг/мл до приблизительно 2,0 мг/мл.

30. Способ по любому из пп.1-29, где введение включает трансдукцию клеток стимулированной композиции вирусным вектором, включающим полинуклеотид, кодирующий рекомбинантный рецептор.

31. Способ по п.30, где вирусный вектор является ретровирусным вектором.

32. Способ по п.30 или по п.31, где вирусный вектор является лентивирусным вектором или гаммаретровирусным вектором.

33. Способ по любому из пп.30-32, где введение производят в присутствии вещества, способствующего трансдукции.

34. Способ по п.33, где вещество, способствующее трансдукции, представляет собой или включает протамина сульфат, необязательно от 1 мкг/мл до 50 мкг/мл или от приблизительно 1 мкг/мл до приблизительно 50 мкг/мл протамина сульфата; производное фибронектина, способствующее трансдукции; и/или RetroNectin.

35. Способ по любому из пп.1-34, где введение включает трансфекцию клеток стимулированной композиции вектором, включающим полинуклеотид, кодирующий рекомбинантный рецептор.

36. Способ по п.35, где вектор является транспозоном, необязательно транспозоном Sleeping Beauty (SB) или транспозоном Piggybac.

37. Способ по любому из пп.1-36, дополнительно включающий культивирование модифицированной композиции при условиях, вызывающих пролиферацию или размножение модифицированных клеток, с получением, таким образом, готовой композиции, включающей модифицированные Т-клетки.

38. Способ по п.37, где культивирование производят в присутствии одного или более цитокинов, где по меньшей мере один цитокин представляет собой или включает рекомбинантный человеческий IL-2.

39. Способ по п.37 или по п.38, где стимулирующий реагент удаляют из модифицированной композиции перед культивированием.

40. Способ по п.39, где стимулирующее средство удаляют через или меньше чем через 7 дней после начала инкубирования.

41. Способ по п.39 или по п.40, где стимулирующий реагент удаляют от 3 дней до 6 дней или от приблизительно 3 дней до приблизительно 6 дней после начала инкубирования.

42. Способ по любому из пп.37-41, где стимулирующий реагент удаляют через или через приблизительно 4 дня после начала инкубирования.

43. Способ по любому из пп.39-42, где удаление сфер включает воздействие на клетки модифицированной композиции магнитного поля.

44. Способ получения композиции модифицированных клеток, включающий культивирование в присутствии одного или более цитокинов композиции модифицированных клеток, включающей CD4+ первичные человеческие Т-клетки, включающие клетки, модифицированные рекомбинантным рецептором, где по меньшей

мере один цитокин представляет собой или включает рекомбинантный человеческий IL-2; где способ приводит к пролиферации или экспансии клеток в композиции с получением готовой композиции, включающей модифицированные CD4+ клетки.

45. Способ по п.44, где пролиферация или размножение приводят к, приблизительно или по меньшей мере к 2-кратному, 3-кратному, 4-кратному, 5-кратному или больше чем 5-кратному увеличению количества CD4+ Т-клеток, модифицированных рекомбинантным рецептором.

46. Способ по п.44 или 45, где:

композиция модифицированных клеток включает больше чем приблизительно 70%, больше чем или больше чем приблизительно 75%, больше чем или больше чем приблизительно 80%, больше чем или больше чем приблизительно 85%, больше чем или больше чем приблизительно 90%, больше чем или больше чем приблизительно 95% или больше чем или больше чем приблизительно 98% CD4+ первичных человеческих Т-клеток или CD4+ клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор; и/или

композиция модифицированных клеток состоит по существу из CD4+ первичных человеческих Т-клеток.

47. Способ по любому из пп.44-46, где концентрация рекомбинантного IL-2 составляет от 50 МЕ/мл до 500 МЕ/мл или от приблизительно 50 МЕ/мл до приблизительно 500 МЕ/мл.

48. Способ по любому из пп.38-47, где один или более цитокинов дополнительно включают IL-7 и/или IL-15, где, необязательно, концентрация IL-7 составляет от 500 МЕ/мл до 2000 МЕ/мл или от приблизительно 500 МЕ/мл до приблизительно 2000 МЕ/мл, и/или концентрация IL-15 составляет от 5 МЕ/мл до 50 МЕ/мл или от приблизительно 5 МЕ/мл до приблизительно 50 МЕ/мл.

49. Способ по любому из пп.44-48, где композицию модифицированных клеток получают способом, включающим:

(а) инкубирование при стимулирующих условиях исходной композиции, включающей первичные Т-клетки, обогащенные CD4+ первичными человеческими Т-клетками, где указанные стимулирующие условия включают присутствие: (i) стимулирующего реагента, способного к активации одного или более внутриклеточных сигнальных доменов одного или более компонентов комплекса TCR и/или одного или более внутриклеточных сигнальных доменов одной или более костимулирующих молекул, и (ii) одного или более цитокинов, где по меньшей мере один цитокин представляет собой или включает рекомбинантный человеческий IL-2, с получением, таким образом, стимулированной композиции; и

(b) введение рекомбинантного рецептора в стимулированную композицию с получением, таким образом, модифицированной композиции, включающей модифицированные Т-клетки.

50. Способ по п.49, где:

исходная композиция включает больше чем или больше чем приблизительно 70%,

больше чем или больше чем приблизительно 75%, больше чем или больше чем приблизительно 80%, больше чем или больше чем приблизительно 85%, больше чем или больше чем приблизительно 90%, больше чем или больше чем приблизительно 95% или больше чем или больше чем приблизительно 98% CD4+ первичных человеческих Т-клеток; и/или

исходная композиция состоит по существу из CD4+ первичных человеческих Т-клеток.

51. Способ по п.49 или по п.50, где один или более цитокинов дополнительно включают IL-7 и/или IL-15.

52. Способ по любому из пп.37-51, где культивирование производят в присутствии поверхностно-активного вещества.

53. Способ по любому из пп.37-52, где по меньшей мере часть культивирования производят при непрерывном перемешивании и/или перфузии.

54. Способ получения композиции модифицированных клеток, включающий культивирование, в присутствии одного или более цитокинов, композиции модифицированных клеток, включающей CD4+ и/или CD8+ первичные человеческие Т-клетки, включающие клетки, модифицированные рекомбинантным рецептором, где культивирование производят в присутствии поверхностно-активного вещества, и/или по меньшей мере часть культивирования производят при непрерывном перемешивании и/или перфузии;

где способ приводит к пролиферации или экспансии клеток в композиции с получение готовой композиции, включающей модифицированные CD4+ и/или CD8+ Т-клетки.

55. Способ по п.54, где:

композиция модифицированных клеток включает больше чем или больше чем приблизительно 70%, больше чем или больше чем приблизительно 75%, больше чем или больше чем приблизительно 80%, больше чем или больше чем приблизительно 85%, больше чем или больше чем приблизительно 90%, больше чем или больше чем приблизительно 95% или больше чем или больше чем приблизительно 98% CD4+ и/или CD8+ первичных человеческих Т-клеток или CD4+ и/или CD8+ первичных Т-клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор; и/или

композиция модифицированных клеток состоит по существу из CD4+ и/или CD8+ первичных человеческих Т-клеток.

56. Способ по п.54 или по п.55, где пролиферация или экспансия приводят к, приблизительно или по меньшей мере к 2-кратному, 3-кратному, 4-кратному, 5-кратному или больше чем 5-кратному увеличению количества CD4+ и/или CD8+ Т-клеток, модифицированных рекомбинантным рецептором.

57. Способ по п.55, где один или более цитокинов выбраны из рекомбинантного IL-2, рекомбинантного IL-7 и/или рекомбинантного IL-15.

58. Способ по п.56 или по п.57, где:

концентрация рекомбинантного IL-2 составляет от 50 до 500 МЕ/мл или от приблизительно 50 до приблизительно 500 МЕ/мл;

концентрация рекомбинантного IL-7 составляет от 500 МЕ/мл до 2000 МЕ/мл или от приблизительно 500 МЕ/мл до приблизительно 2000 МЕ/мл; и/или

концентрация рекомбинантного IL-15 составляет от 5 МЕ/мл до 50 МЕ/мл или от приблизительно 5 МЕ/мл до приблизительно 50 МЕ/мл.

59. Способ по п.54, где:

композиция модифицированных клеток включает больше чем приблизительно 70%, больше чем или больше чем приблизительно 75%, больше чем или больше чем приблизительно 80%, больше чем или больше чем приблизительно 85%, больше чем или больше чем приблизительно 90%, больше чем или больше чем приблизительно 95% или больше чем или больше чем приблизительно 98% CD4+ первичных человеческих Т-клеток или CD4+ первичных человеческих Т-клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор; и/или

композиция модифицированных клеток состоит по существу из CD4+ первичных человеческих Т-клеток.

60. Способ по п.59, где пролиферация или экспансия приводят к, приблизительно или по меньшей мере к 2-кратному, 3-кратному, 4-кратному, 5-кратному или больше чем 5-кратному увеличению количества CD8+ Т-клеток, модифицированных рекомбинантным рецептором.

61. Способ по п.54 или по п.55, где один или более цитокинов выбраны из рекомбинантного IL-2, рекомбинантного IL-7 и рекомбинантного IL-15.

62. Способ по п.54, где:

композиция модифицированных клеток включает больше чем приблизительно 70%, больше чем или больше чем приблизительно 75%, больше чем или больше чем приблизительно 80%, больше чем или больше чем приблизительно 85%, больше чем или больше чем приблизительно 90%, больше чем или больше чем приблизительно 95% или больше чем или больше чем приблизительно 98% CD8+ первичных человеческих Т-клеток или CD8+ первичных человеческих Т-клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор; и/или

композиция модифицированных клеток состоит по существу из CD8+ первичных человеческих Т-клеток.

63. Способ по п.54 или по п.62, где один или более цитокинов выбраны из рекомбинантного IL-2 и рекомбинантного IL-15.

64. Способ по любому из пп.52-63, где поверхностно-активное вещество включает полоксамер, где, необязательно, полоксамер присутствует в концентрации от 0,5 мкл/мл до 5 мкл/мл или от приблизительно 0,5 мкл/мл до приблизительно 5 мкл/мл.

65. Способ по п.64, где полоксамер представляет собой Полоксамер 188.

66. Способ по любому из пп.54-65, где композицию модифицированных клеток получают способом, включающим:

(а) инкубирование при стимулирующих условиях исходной композиции, включающей первичные Т-клетки, обогащенные CD4+ и/или CD8+ первичными человеческими Т-клетками, где указанные стимулирующие условия включают присутствие: (i) стимулирующего реагента, способного к активации одного или более внутриклеточных сигнальных доменов одного или более компонентов комплекса TCR и/или одного или более внутриклеточных сигнальных доменов одной или более костимулирующих молекул, и (ii) одного или более цитокинов с получением, таким образом, стимулированной композиции; и

(b) введение рекомбинантного рецептора в стимулированную композицию с получением, таким образом, модифицированной композиции, включающей модифицированные Т-клетки.

67. Способ по п.66, где:

исходная композиция включает больше чем или больше чем приблизительно 70%, больше чем или больше чем приблизительно 75%, больше чем или больше чем приблизительно 80%, больше чем или больше чем приблизительно 85%, больше чем или больше чем приблизительно 90%, больше чем или больше чем приблизительно 95% или больше чем или больше чем приблизительно 98% CD4+ и/или CD8+ первичных человеческих Т-клеток; и/или

исходная композиция состоит по существу из CD4+ и/или CD8+ первичных человеческих Т-клеток.

68. Способ по п.66 или по п.67, где один или более цитокинов выбраны из рекомбинантного IL-2, рекомбинантного IL-7 и/или рекомбинантного IL-15.

69. Способ по п.66, где:

исходная композиция включает больше чем приблизительно 70%, больше чем или больше чем приблизительно 75%, больше чем или больше чем приблизительно 80%, больше чем или больше чем приблизительно 85%, больше чем или больше чем приблизительно 90%, больше чем или больше чем приблизительно 95% или больше чем или больше чем приблизительно 98% CD4+ первичных человеческих Т-клеток; и/или

исходная композиция состоит по существу из CD4+ первичных человеческих Т-клеток.

70. Способ по п.66 или по п.69, где один или более цитокинов выбраны из рекомбинантного IL-2, рекомбинантного IL-7 и рекомбинантного IL-15.

71. Способ по п.66, где:

исходная композиция включает больше чем приблизительно 70%, больше чем или больше чем приблизительно 75%, больше чем или больше чем приблизительно 80%, больше чем или больше чем приблизительно 85%, больше чем или больше чем приблизительно 90%, больше чем или больше чем приблизительно 95% или больше чем или больше чем приблизительно 98% CD8+ первичных человеческих Т-клеток; и/или

исходная композиция состоит по существу из CD8+ первичных человеческих Т-клеток.

72. Способ по п.66 или по п.71, где один или более цитокинов выбраны из рекомбинантного IL-2 и рекомбинантного IL-15.

73. Способ по любому из пп.49-53 и 66-72, где стимулирующий реагент включает основное средство, которое специфично связывается с членом комплекса TCR, которое, необязательно, специфично связывается с CD3.

74. Способ по п.73, где стимулирующий реагент дополнительно включает дополнительное средство, которое специфично связывается с Т-клеточной костимулирующей молекулой, где, необязательно, костимулирующая молекула выбрана из CD28, CD137 (4-1-BB), OX40 или ICOS.

75. Способ по п.73 или по п.74, где основное и/или дополнительное средства включают антитело, где, необязательно, стимулирующий реагент включает инкубирование с антителом против CD3 и антителом против CD28 или их антигенсвязывающим фрагментом.

76. Способ по любому из пп.73-75, где основное средство и/или дополнительное средство присутствует на поверхности твердой подложки.

77. Способ по п.76, где твердая подложка представляет собой или включает сферу.

78. Способ по п.77, где сфера включает диаметр больше чем или больше чем приблизительно 3,5 мкм, но не больше чем приблизительно 9 мкм или не больше чем приблизительно 8 мкм, или не больше чем приблизительно 7 мкм, или не больше чем приблизительно 6 мкм, или не больше чем приблизительно 5 мкм.

79. Способ по п.77 или по п.78, где сфера включает диаметр 4,5 мкм или приблизительно 4,5 мкм.

80. Способ по любому из пп.77-79, где сфера является инертной.

81. Способ по любому из пп.77-80, где сфера представляет собой или включает полистирольную поверхность.

82. Способ по любому из пп.77-81, где сфера является магнитной или суперпарамагнитной.

83. Способ по любому из пп.77-82, где отношение сфер к клеткам составляет меньше чем 3:1 или меньше чем приблизительно 3:1.

84. Способ по любому из пп.77-83, где отношение сфер к клеткам составляет от 2:1 до 0,5:1 или от приблизительно 2:1 до приблизительно 0,5:1.

85. Способ по любому из пп.77-84, где отношение сфер к клеткам составляет 1:1 или приблизительно 1:1.

86. Способ по любому из пп.49-53 и 66-85, где инкубирование проводят в присутствии одного или более антиоксидантов.

87. Способ по п.86, где один или более антиоксидантов включают серосодержащий антиоксидант.

88. Способ по п.86 или по п.87, где один или более антиоксидантов включают предшественник глутатиона.

89. Способ по любому из пп.86-88, где один или более антиоксидантов включают

N-ацетилцистеин (NAC), где, необязательно, NAC присутствует в концентрации от 0,2 мг/мл до 2,0 мг/мл или от приблизительно 0,2 мг/мл до приблизительно 2,0 мг/мл.

90. Способ по любому из пп.49-53 и 66-89, где введение включает трансдукцию клеток стимулированной композиции вирусным вектором, включающим полинуклеотид, кодирующий рекомбинантный рецептор.

91. Способ по п.90, где вирусный вектор является ретровирусным вектором.

92. Способ по п.90 или по п.91, где вирусный вектор является лентивирусным вектором или гаммаретровирусным вектором.

93. Способ по любому из пп.49-53 и 66-92, где введение производят в присутствии вещества, способствующего трансдукции.

94. Способ по п.93, где вещество, способствующее трансдукции, представляет собой или включает протамина сульфат, необязательно от 1 мкг/мл до 50 мкг/мл или от приблизительно 1 мкг/мл до приблизительно 50 мкг/мл протамина сульфата; производное фибронектина, способствующее трансдукции; и/или RetroNectin.

95. Способ по любому из пп.49-53 и 66-89, где введение включает трансфекцию клеток стимулированной композиции вектором, включающим полинуклеотид, кодирующий рекомбинантный рецептор.

96. Способ по п.95, где вектор является транспозоном, необязательно транспозоном Sleeping Beauty (SB) или транспозоном Piggybac.

97. Способ по любому из пп.44-69, где композиция модифицированных клеток не включает стимулирующий реагент, и/или стимулирующий реагент был по существу удален из композиции перед культивированием, где указанный стимулирующий реагент включает реагент, способный к активации одного или более внутриклеточных сигнальных доменов одного или более компонентов комплекса TCR и/или одного или более внутриклеточных сигнальных доменов одной или более костимулирующих молекул.

98. Способ по любому из пп.37-97, где культивирование проводят, по меньшей мере, до тех пор, пока готовая композиция не будет включать пороговое количество Т-клеток, пороговое количество жизнеспособных Т-клеток, пороговую концентрацию Т-клеток или пороговую концентрацию жизнеспособных Т-клеток.

99. Способ по п.98, где культивирование продолжают в течение по меньшей мере одного дня после достижения порогового количества Т-клеток, порогового количества жизнеспособных Т-клеток, пороговой концентрации Т-клеток или пороговой концентрации жизнеспособных Т-клеток.

100. Способ по п.98 или по п.99, где пороговое количество Т-клеток, пороговое количество жизнеспособных Т-клеток, пороговая концентрация Т-клеток или пороговая концентрация жизнеспособных Т-клеток по меньшей мере в 2 раза, по меньшей мере в 3 раза, по меньшей мере в 4 раза, по меньшей мере в 5 или более раз больше, чем количество или концентрация, или жизнеспособное количество или концентрация в композиции модифицированных клеток до культивирования.

101. Способ по любому из пп.37-100, где культивирование проводят в течение от 2

дней до 10 дней включительно, и/или культивирование проводят в течение по меньшей мере 10 дней.

102. Способ по любому из пп.37-100, где культивирование проводят в течение от 2 дней до 10 дней включительно, и/или культивирование проводят до по меньшей мере 9 дней после начала инкубирования.

103. Способ по любому из пп.37-100, где культивирование проводят в течение по меньшей мере 4 дней.

104. Способ по любому из пп.37-101, где после культивирования собирают клетки готовой композиции.

105. Способ по п.104, где промежуток времени от начала инкубирования до сбора клеток готовой композиции составляет от 7 дней до 15 дней или от приблизительно 7 дней до приблизительно 15 дней.

106. Способ по п.104 или по п.105, где промежуток времени от начала инкубирования до сбора клеток готовой композиции составляет от 9 дней до 13 дней или от приблизительно 9 дней до приблизительно 13 дней.

107. Способ по любому из пп.104-106, где промежуток времени от начала инкубирования до сбора клеток готовой композиции составляет от 8 дней до 13 дней или от приблизительно 8 дней до приблизительно 13 дней.

108. Способ по любому из пп.37-107, дополнительно включающий включение клеток готовой композиции в состав для криоконсервации и/или введения субъекту, необязательно в присутствии фармацевтически приемлемого вспомогательного вещества.

109. Способ по п.108, где клетки готовой композиции включают в состав в присутствии криопротектора.

110. Способ по п.109, где криопротектор включает ДМСО.

111. Способ по любому из пп.108-110, где клетки готовой композиции помещают в контейнер, необязательно флакон или пакет.

112. Способ по любому из пп.1-43 и 49-53 и 66-89, дополнительно включающий выделение CD4+ и/или CD8+ Т-клеток из биологического образца перед инкубированием.

113. Способ по п.112, где выделение включает отбор клеток по поверхностной экспрессии CD4 и/или CD8, необязательно посредством положительного или отрицательного отбора.

114. Способ по п.113 или по п.112, где выделение включает проведение иммуноаффинного отбора.

115. Способ по любому из пп.112-114, где биологический образец включает первичные Т-клетки, полученные у субъекта.

116. Способ по п.115, где субъектом является человек.

117. Способ по любому из пп.112-114, где биологический образец представляет собой или включает образец цельной крови, образец лейкоцитомбоцитарного слоя, образец мононуклеарных клеток периферической крови (МКПК), нефракционированный образец Т-клеток, образец лимфоцитов, образец лейкоцитов, продукт афереза или продукт



лейкафереза.

118. Способ по любому из пп.1-117, где рекомбинантный рецептор способен к связыванию с антигеном-мишенью, ассоциированным с, специфичным для и/или экспрессирующимся на клетке или ткани заболевания, нарушения или состояния.

119. Способ по п.118, где заболевание, нарушение или состояние является инфекционным заболеванием или нарушением, аутоиммунным заболеванием, воспалительным заболеванием или опухолью или раком.

120. Способ по п.118 или 119, где антиген-мишень является опухолевым антигеном.

121. Способ по любому из пп.118-120, где антиген-мишень 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, PЭА, поверхностного антигена гепатита В, CD23, CD24, CD30, CD33, CD38, CD44, CD44v6, CD44v7/8, CD123, CD138, CD171, раково-эмбрионального антигена (PЭА), CE7, циклина, циклина A2, с-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, эстрогенового рецептора, фетального AchR, рецептора фолата альфа, фолат-связывающего белка (FBP), FCRL5, FCRH5, фетального рецептора ацетилхолина, G250/CAIX, GD2, GD3, gp100, сопряженного с G-белком рецептора 5D (GPCR5D), Her2/neu (рецепторной тирозинкиназы erbB2), HMW-MAA, IL-22R-альфа, рецептора IL-13 альфа-2 (IL-13Ra2), рецептора с доменом вставки киназы (kdr), легкой цепи каппа, Льюис Y, молекулы клеточной адгезии L1 (L1-CAM), меланома-ассоциированного антигена (MAGE)-A1, MAGE-A3, MAGE-A6, MART-1, мезотелина, мышинового CMV, муцина 1 (MUC1), MUC16, NCAM, NKG2D, лигандов NKG2D, NY-ESO-1, O-ацетилированного GD2 (OGD2), онкофетального антигена, предпочтительно экспрессируемого антигена меланомы (PRAME), PSCA, прогестеронового рецептора, сурвивина, ROR1, TAG72, tEGFR, рецепторов VEGF, VEGF-R2, белка опухоли Вильмса 1 (WT-1), патогенспецифического антигена и антигена, ассоциированного с универсальной меткой.

122. Способ по любому из пп.1-121, где рекомбинантный рецептор представляет собой или включает функциональный не-TCR антигенный рецептор или TCR или его антигенсвязывающий фрагмент.

123. Способ по любому из пп.1-122, где рекомбинантный рецептор является химерным антигенным рецептором (CAR).

124. Способ по любому из пп.1-123, где рекомбинантный рецептор представляет собой CAR против CD19.

125. Способ по п.123, где химерный антигенный рецептор включает внеклеточный домен, включающий антигенсвязывающий домен.

126. Способ по п.125, где антигенсвязывающий домен представляет собой или включает антитело или фрагмент антитела, который необязательно является

одноцепочечным фрагментом.

127. Способ по п.126, где фрагмент включает переменные области антитела, соединенные гибким линкером.

128. Способ по п.126 или по п.127, где фрагмент включает scFv.

129. Способ по любому из пп.125-128, где химерный антигенный рецептор дополнительно включает спейсер и/или шарнирную область.

130. Способ по любому из пп.125-129, где химерный антигенный рецептор включает внутриклеточную сигнальную область.

131. Способ по п.130, где внутриклеточная сигнальная область включает внутриклеточный сигнальный домен.

132. Способ по п.131, где внутриклеточный сигнальный домен представляет собой или включает первичный сигнальный домен, сигнальный домен, который способен к индукции первичного сигнала активации в Т-клетке, сигнальный домен компонента Т-клеточного рецептора (TCR) и/или сигнальный домен, включающий иммунорецепторный тирозиновый активирующий мотив (ITAM).

133. Способ по п.132, где внутриклеточный сигнальный домен представляет собой или включает внутриклеточный сигнальный домен цепи CD3, необязательно CD3-дзета (CD3 $\zeta$ ) цепи, или его сигнальную часть.

134. Способ по любому из пп.130-133, где химерный антигенный рецептор дополнительно включает трансмембранный домен, расположенный между внеклеточным доменом и внутриклеточной сигнальной областью.

135. Способ по любому из пп.130-134, где внутриклеточная сигнальная область дополнительно включает костимулирующую сигнальную область.

136. Способ по п.135, где костимулирующая сигнальная область включает внутриклеточный сигнальный домен Т-клеточной костимулирующей молекулы или его сигнальную часть.

137. Способ по п.136 или п.135, где костимулирующая сигнальная область включает внутриклеточный сигнальный домен CD28, 4-1BB или ICOS или его сигнальную часть.

138. Способ по любому из пп.135-137, где костимулирующая сигнальная область расположена между трансмембранным доменом и внутриклеточной сигнальной областью.

139. Способ по любому из пп.98-101, где готовую композицию, включающую пороговое количество или большее количество клеток, получают в результате больше чем или больше чем приблизительно 85%, больше чем или больше чем приблизительно 90% или больше чем или больше чем приблизительно 95% итераций способа.

140. Композиция, включающая модифицированные клетки, полученные способом по любому из пп.1-137.

141. Композиция по п.140, дополнительно включающая фармацевтически приемлемый носитель.

142. Композиция по п.140 или по п.141, включающая криопротектор,

необязательно ДМСО.

143. Изделие, включающее композицию по любому из пп.138-140 и инструкции по введению готовой композиции субъекту.

144. Изделие по п.143, где субъект имеет заболевание или состояние, где, необязательно, рекомбинантный рецептор специфично распознает или специфично связывается с антигеном, ассоциированным с или экспрессируемым или присутствующим на клетках, заболевания или состояния.

145. Изделие по п.143 или 144, где готовая композиция является композицией модифицированных CD4+ Т-клеток.

146. Изделие по п.143 или 144, где готовая композиция является модифицированной композицией CD8+ Т-клеток.

147. Изделие, включающее композицию модифицированных CD4+ Т-клеток, полученную способом по любому из пп.1-11, 13-60, 63-70 или 72-139, композицию модифицированных CD8+ Т-клеток, полученную способом по любому из пп.6-8, 11-43, 54-58, 60-68 или 70-139, и инструкции по введению модифицированных CD4+ Т-клеток и модифицированных CD8+ Т-клеток субъекту.

148. Изделие по п.147, где инструкции предписывают отдельно вводить CD4+ Т-клетки и CD8+ Т-клетки субъекту.

149. Изделие по п.147 или 148, где инструкции предписывают вводить CD4+ Т-клетки и CD8+ Т-клетки субъекту в требуемом соотношении.

150. Способ по любому из пп.1-139, где способ проводят меньше чем за 21 день включительно.

151. Способ по любому из пп.1-139, где способ обеспечивает получение готовой композиции, которую вводят и/или которая готова к введению субъекту в течение, при 95% доверительном интервале, меньше чем за 21 день включительно.

152. Способ по любому из пп.37-137, где во время по меньшей мере части культивирования клетки контролируют на предмет жизнеспособности, концентрации, плотности, количества клеток или комбинации перечисленного.

153. Способ по п.152, где контроль осуществляют с помощью оптического метода, необязательно микроскопии.

154. Способ по п.152 или по п.153, где контроль осуществляют с помощью светлопольной микроскопии, флуоресцентной микроскопии, дифференциальной интерференционной контрастной микроскопии, фазово-контрастной микроскопии, цифровой голографической микроскопии (DHM), дифференциальной цифровой голографической микроскопии (DDHM) или их комбинации.

155. Способ по любому из пп.152-154, где контроль осуществляют с помощью дифференциальной цифровой голографической микроскопии (DDHM).

156. Способ по любому из пп.152-155, где контроль производят периодически или постоянно, во время по меньшей мере части культивирования, необязательно производят по меньшей мере раз в 1 час, 6 часов, 12 часов, 18 часов, 24 часа или 26 часов во время

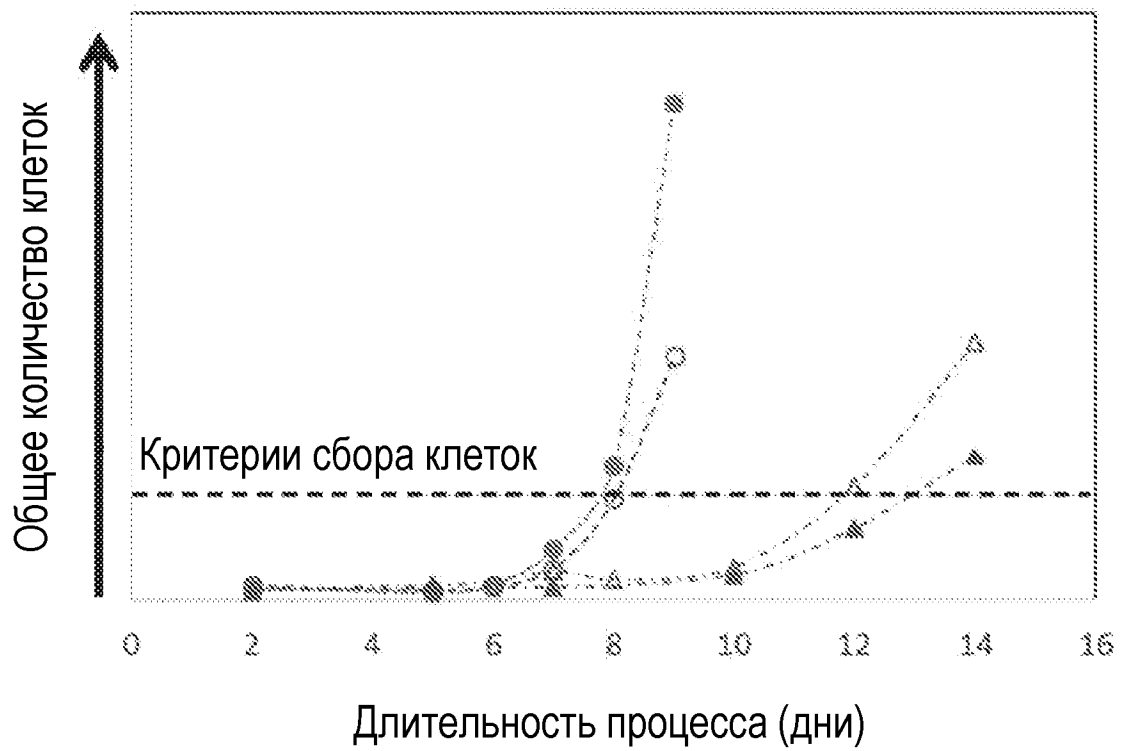
культивирования.

157. Способ по любому из пп.152-156, где контроль производят, пока клетки не достигают порогового количества Т-клеток, порогового количества жизнеспособных Т-клеток, пороговой концентрации Т-клеток или пороговой концентрации жизнеспособных Т-клеток.

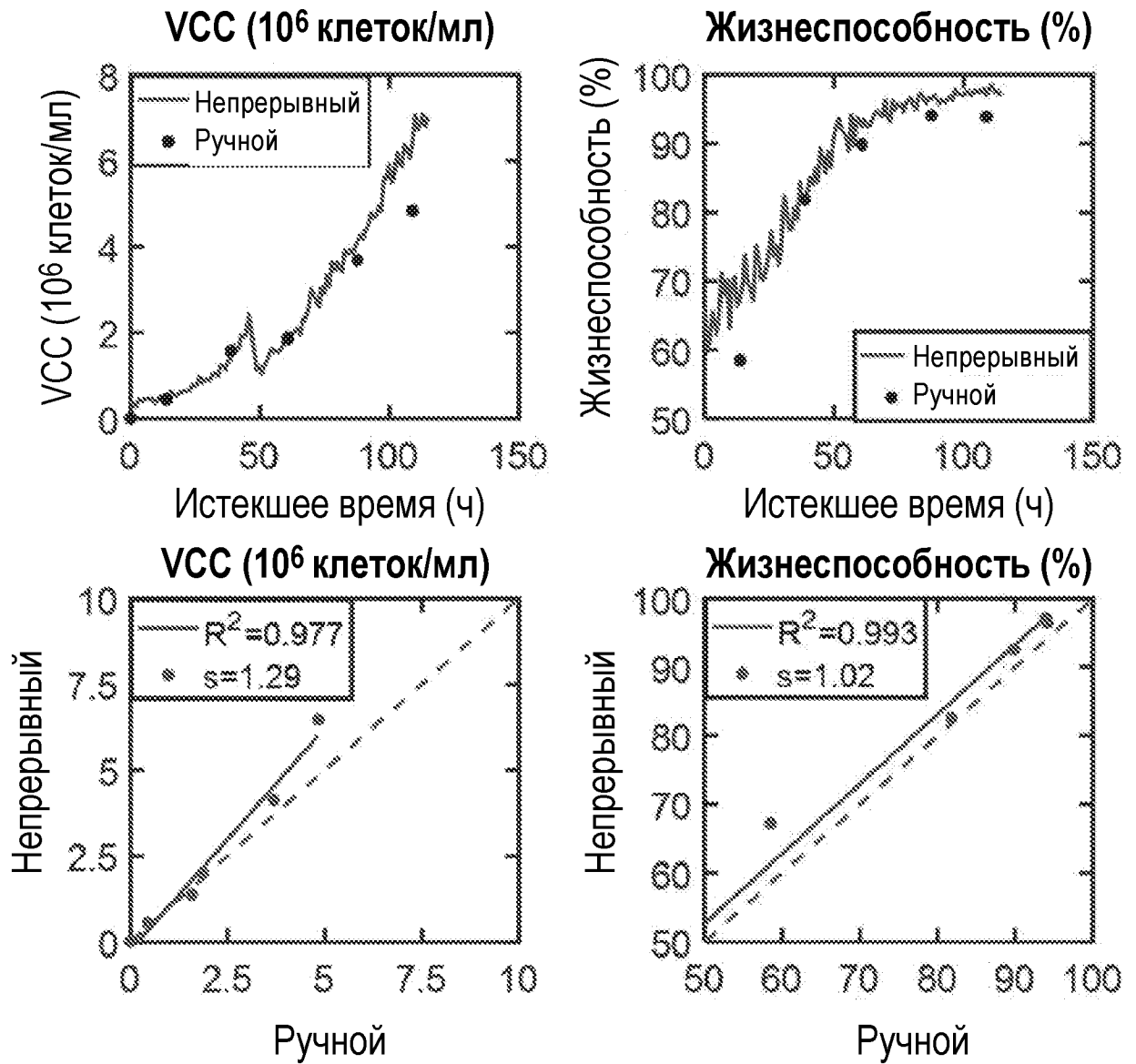
158. Способ по любому из пп.152-157, где контроль и культивирование проводят в закрытой системе.

По доверенности

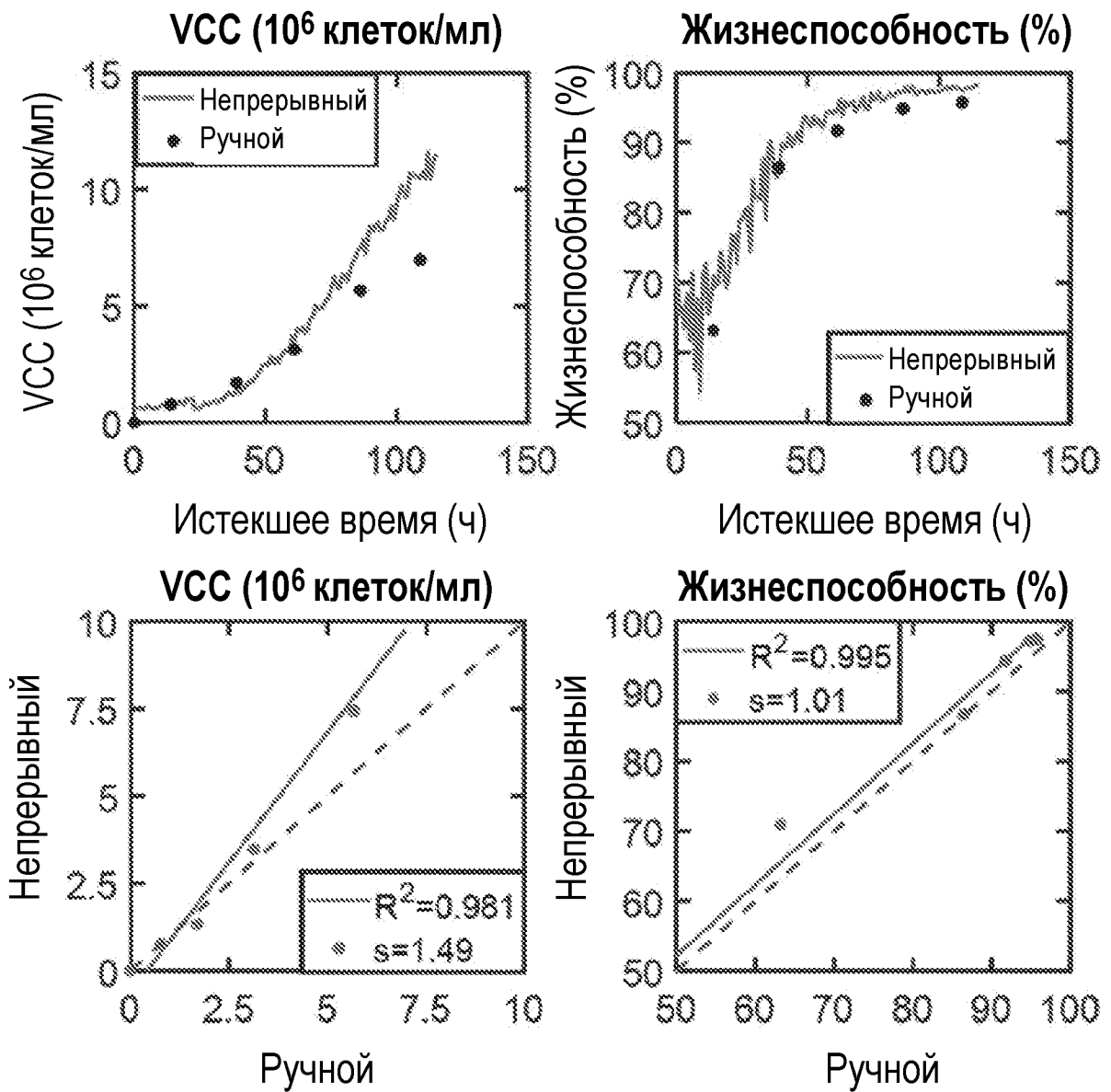
ФИГ.1



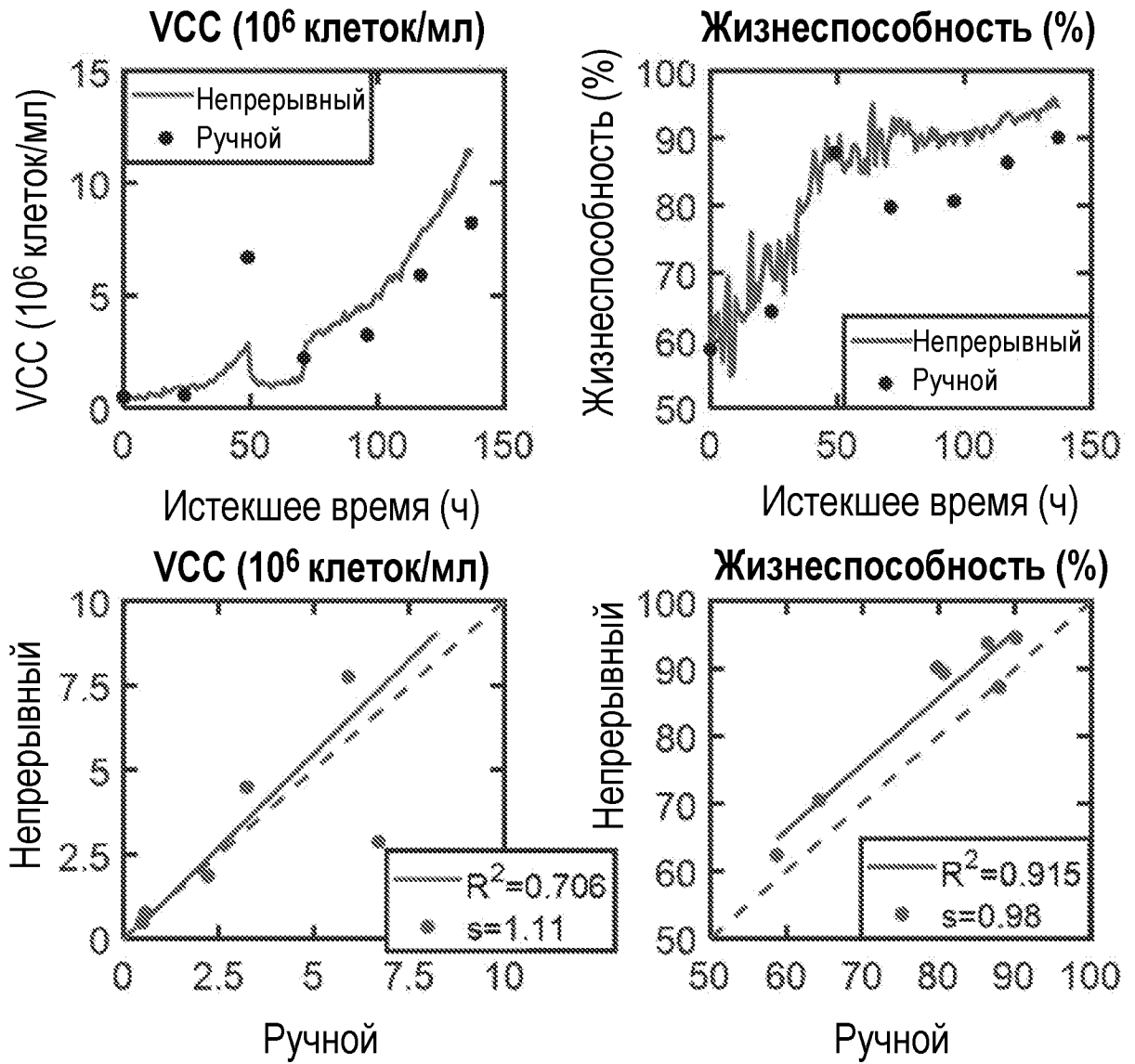
ФИГ.2А



ФИГ.2В

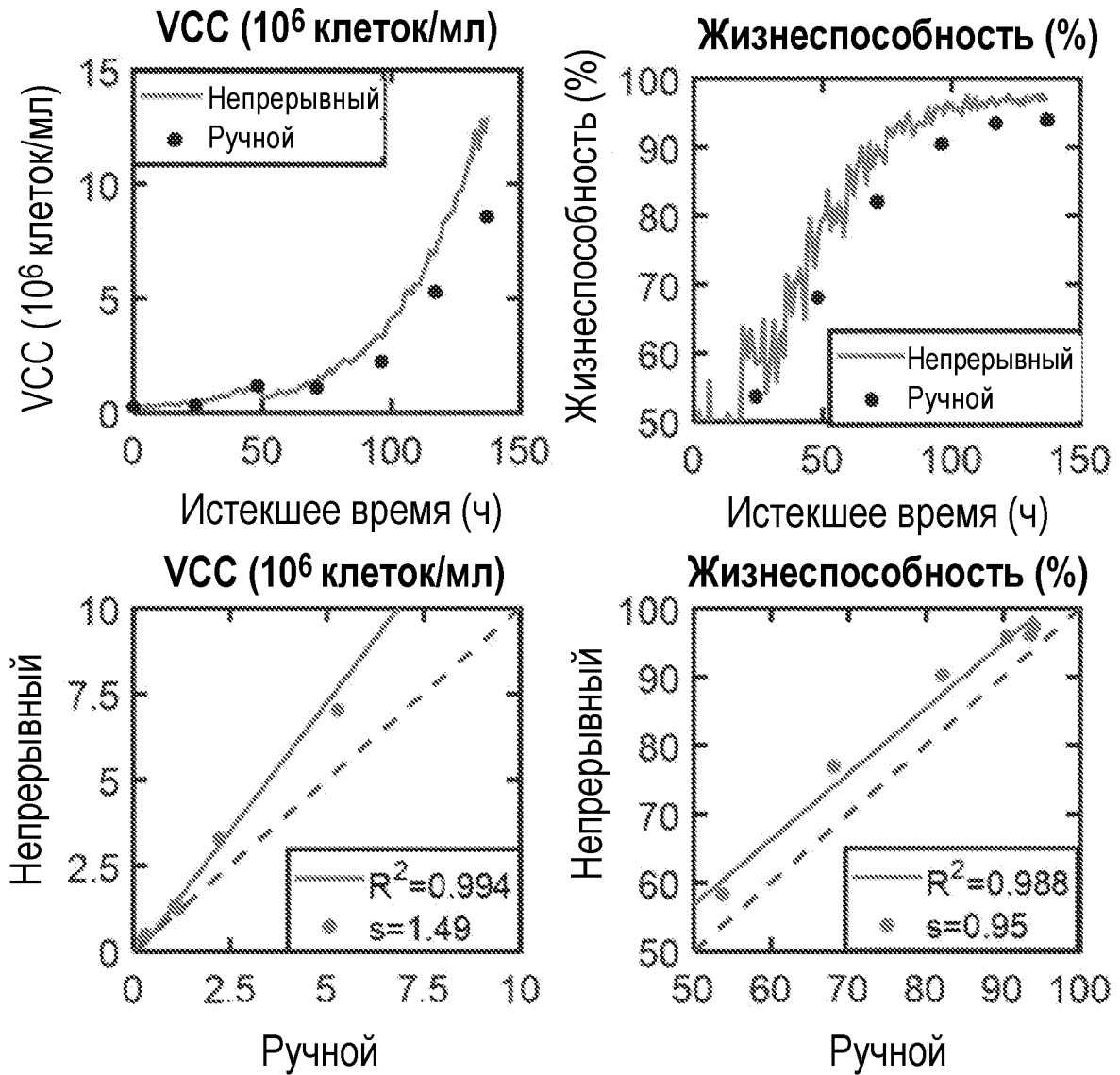


ФИГ.2С





ФИГ.2D



ФИГ.3

