

(19)



Евразийское  
патентное  
ведомство

(21) 202091090 (13) A1

## (12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки  
2020.10.06(51) Int. Cl. C12N 5/0783 (2010.01)  
A61K 35/17 (2015.01)  
C07K 14/725 (2006.01)(22) Дата подачи заявки  
2018.11.01

## (54) СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ Т-КЛЕТОЧНОЙ КОМПОЗИЦИИ

(31) 62/580,435; 62/584,687; 62/699,709;  
62/711,494

(72) Изобретатель:

Брахмандам Арчана, Томпсон  
Лукас Джеймс, Мортенсен Дебора,  
Филварофф Эллен (US)(32) 2017.11.01; 2017.11.10; 2018.07.17;  
2018.07.28

(33) US

(86) PCT/US2018/058812

(74) Представитель:

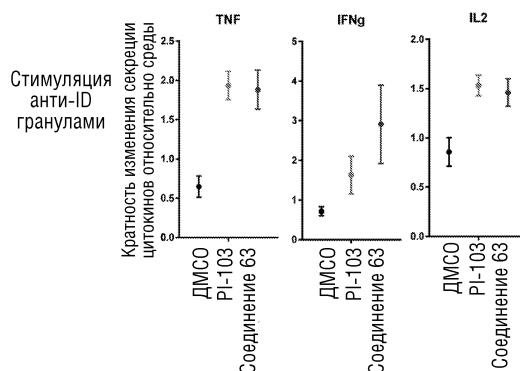
Медведев В.Н. (RU)

(87) WO 2019/090004 2019.05.09

(71) Заявитель:

ДЖУНО ТЕРАПЬЮТИКС, ИНК.;  
СЕЛДЖИН КОРПОРЕЙШН (US)

(57) В изобретении предложены способы получения генетически модифицированных Т-клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор, например, для использования в клеточной терапии. В некоторых аспектах предложенные способы включают один или более этапов инкубации клеток в стимулирующих условиях, введения рекомбинантного полипептида в клетки путем трансдукции или трансфекции и/или культивирования клеток в условиях, стимулирующих пролиферацию и/или размножение, при этом один или более этапов проводят в присутствии средства, ингибирующего активность мишени рапамицина в клетках млекопитающих (mTOR). В некоторых аспектах культивирование проводят в присутствии средства, ингибирующего активность мишени рапамицина в клетках млекопитающих (mTOR). В некоторых аспектах предложенные способы приводят к получению генетически модифицированных Т-клеток с улучшенной персистенцией и/или противоопухолевой активностью *in vivo*.



A1

202091090

202091090

A1

## ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-562702EA/032

### СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ Т-КЛЕТОЧНОЙ КОМПОЗИЦИИ

#### ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

[0001] По настоящей заявке испрашивается приоритет на основании предварительной патентной заявки США 62/711494, поданной 28 июля 2018 г., предварительной патентной заявки США 62/699709, поданной 17 июля 2018 г., предварительной патентной заявки США 62/584687, поданной 10 ноября 2017 г., и предварительной патентной заявки США 62/580435, поданной 1 ноября 2017 г., содержание которых включено в настоящий документ посредством ссылки в полном объеме.

#### ВКЛЮЧЕНИЕ ПОСРЕДСТВОМ ССЫЛКИ СПИСКА ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

[0002] Настоящая заявка была подана со списком последовательностей в электронном формате. Список последовательностей предоставлен в виде файла с названием 735042013440SeqList.txt, который был создан 1 ноября 2018 г. и имеет размер 57098 байт. Информация в электронном формате, относящаяся к списку последовательностей, включена в настоящий документ посредством ссылки в полном объеме.

#### ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ, К КОТОРОЙ ОТНОСИТСЯ ИЗОБРЕТЕНИЕ

[0003] Настоящее изобретение относится к способам получения генетически модифицированных Т-клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор, например, для использования в клеточной терапии. В некоторых аспектах предложенные способы включают один или более этапов инкубации клеток в стимулирующих условиях, введения рекомбинантного полипептида в клетки путем трансдукции или трансфекции, и/или культивирования клеток в условиях, стимулирующих пролиферацию и/или размножение, при этом один или более этапов проводят в присутствии средства, ингибирующего активность мишени рапамицина в клетках млекопитающих (mTOR). В некоторых аспектах культивирование проводят в присутствии средства, ингибирующего активность мишени рапамицина в клетках млекопитающих (mTOR). В некоторых аспектах предложенные способы приводят к получению генетически модифицированных Т-клеток с улучшенной персистенцией и/или противоопухолевой активностью *in vivo*.

#### ПРЕДПОСЫЛКИ СОЗДАНИЯ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0004] Различные способы клеточной терапии доступны для лечения заболеваний и состояний. В число способов клеточной терапии входят способы с использованием иммунных клеток, таких как Т-клетки, генетически модифицированные рекомбинантным рецептором, таким как химерный антигенный рецептор. Существует потребность в усовершенствованных способах производства и/или генетической модификации таких клеточных терапевтических средств, в том числе, в разработке более эффективного способа и/или усовершенствованного клеточного препарата. Предложены способы

получения генетически модифицированных клеток, композиций генетически модифицированных клеток, наборов и изделий, а также способы лечения, удовлетворяющие данную потребность.

#### СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0005] В настоящем документе предложен способ получения композиции генетически модифицированных клеток, включающий культивирование в присутствии средства, ингибирующего активность mTOR, композиции генетически модифицированных клеток, содержащей первичные человеческие Т-клетки, включающие клетки, генетически модифицированные рекомбинантным рецептором, при этом клетки в композиции не подвергались воздействию средства до культивирования; и при этом способ приводит к пролиферации или размножению клеток в композиции, с получением произведенной композиции, содержащей генетически модифицированные Т-клетки. В конкретных вариантах осуществления любого из предложенных способов первичные Т-клетки представляют собой CD4<sup>+</sup> и/или CD8<sup>+</sup> Т-клетки. В некоторых вариантах осуществления любого из предложенных способов композиция генетически модифицированных Т-клеток содержит обогащенные CD4<sup>+</sup> Т-клетки. В конкретных вариантах осуществления любого из предложенных способов композиция генетически модифицированных Т-клеток содержит обогащенные CD8<sup>+</sup> Т-клетки.

[0006] В настоящем документе предложен способ получения композиции генетически модифицированных клеток, включающий культивирование в присутствии средства, ингибирующего активность mTOR, композиции генетически модифицированных клеток, содержащей обогащенные CD4<sup>+</sup> и/или обогащенные CD8<sup>+</sup> первичные человеческие Т-клетки, включающие Т-клетки, генетически модифицированные рекомбинантным рецептором; при этом способ приводит к пролиферации или размножению клеток в композиции, с получением произведенной композиции, содержащей генетически модифицированные обогащенные CD4<sup>+</sup> и/или обогащенные CD8<sup>+</sup> Т-клетки. В некоторых вариантах осуществления любого из предложенных способов композиция генетически модифицированных Т-клеток содержит более или более примерно 70%, более или более примерно 75%, более или более примерно 80%, более или более примерно 85%, более или более примерно 90%, более или более примерно 95%, или более или более примерно 98% CD4<sup>+</sup> первичных человеческих Т-клеток; и/или исходная композиция состоит в основном из CD4<sup>+</sup> первичных человеческих Т-клеток. В конкретных вариантах осуществления любого из предложенных способов композиция генетически модифицированных Т-клеток содержит более или более примерно 70%, более или более примерно 75%, более или более примерно 80%, более или более примерно 85%, более или более примерно 90%, более или более примерно 95%, или более или более примерно 98% CD8<sup>+</sup> первичных человеческих Т-клеток; и/или исходная композиция состоит в основном из CD8<sup>+</sup> первичных человеческих Т-клеток. В конкретных вариантах осуществления любого из предложенных способов композиция генетически модифицированных Т-клеток содержит более или более

примерно 70%, более или более примерно 75%, более или более примерно 80%, более или более примерно 85%, более или более примерно 90%, более или более примерно 95%, или более или более примерно 98% CD4+ и CD8+ первичных человеческих Т-клеток; и/или исходная композиция состоит в основном из CD4+ и CD8+ первичных человеческих Т-клеток.

[0007] В конкретных вариантах осуществления любого из предложенных способов культивирование проводят в присутствии одного или более цитокинов. В некоторых вариантах осуществления любого из предложенных способов один или более цитокинов включают один или более из IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-12, IL-15, G-CSF и GM-CSF. В конкретных вариантах осуществления любого из предложенных способов один или более цитокинов представляют собой рекомбинантные цитокины.

[0008] В конкретных вариантах осуществления любого из предложенных способов до культивирования способ дополнительно включает: (a) инкубирование в стимулирующих условиях исходной композиции, содержащей первичные Т-клетки, при этом указанные стимулирующие условия включают присутствие 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, с получением стимулированной композиции; и (b) введение рекомбинантного рецептора в стимулированную композицию, с получением генетически модифицированной композиции, содержащей генетически модифицированные Т-клетки.

[0009] В некоторых вариантах осуществления любого из предложенных способов исходная композиция, стимулированная композиция и/или генетически модифицированная композиция содержит первичные CD4+ и/или CD8+ Т-клетки. В конкретных вариантах осуществления любого из предложенных способов исходная композиция, стимулированная композиция и/или генетически модифицированная композиция содержит обогащенные CD4+ Т-клетки. В конкретных вариантах осуществления любого из предложенных способов исходная композиция, стимулированная композиция и/или генетически модифицированная композиция содержит обогащенные CD8+ Т-клетки.

[0010] В настоящем документе предложен способ получения композиции генетически модифицированных клеток, включающий: (a) инкубирование в стимулирующих условиях исходной композиции, содержащей Т-клетки, обогащенные по CD4+ и/или CD8+ первичным человеческим Т-клеткам, при этом 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) средства, ингибирующего активность mTOR; и (b) введение рекомбинантного рецептора в стимулированную композицию, с получением генетически модифицированной

композиции, содержащей генетически модифицированные Т-клетки.

[0011] В некоторых вариантах осуществления любого из предложенных способов исходная композиция, стимулированная композиция и/или генетически модифицированная композиция содержит более или более примерно 70%, более или более примерно 75%, более или более примерно 80%, более или более примерно 85%, более или более примерно 90%, более или более примерно 95%, или более или более примерно 98% CD4<sup>+</sup> первичных человеческих Т-клеток; и/или исходная композиция состоит в основном из CD4<sup>+</sup> первичных человеческих Т-клеток. В конкретных вариантах осуществления любого из предложенных способов исходная композиция, стимулированная композиция и/или генетически модифицированная композиция содержит более или более примерно 70%, более или более примерно 75%, более или более примерно 80%, более или более примерно 85%, более или более примерно 90%, более или более примерно 95%, или более или более примерно 98% CD8<sup>+</sup> первичных человеческих Т-клеток; и/или исходная композиция состоит в основном из CD8<sup>+</sup> первичных человеческих Т-клеток. В конкретных вариантах осуществления любого из предложенных способов исходная композиция, стимулированная композиция и/или генетически модифицированная композиция содержит более или более примерно 70%, более или более примерно 75%, более или более примерно 80%, более или более примерно 85%, более или более примерно 90%, более или более примерно 95%, или более или более примерно 98% CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> первичных человеческих Т-клеток; и/или исходная композиция состоит в основном из CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> первичных человеческих Т-клеток.

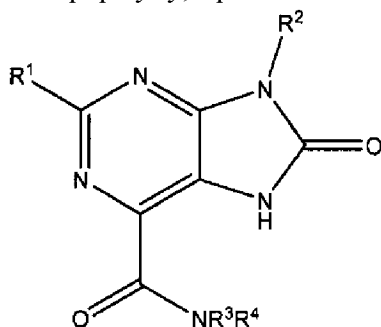
[0012] В конкретных вариантах осуществления любого из предложенных способов средство, ингибирующее активность mTOR, представляет собой малую молекулу, малую органическую молекулу, полинуклеотид, олигонуклеотид, кРНК или полипептид. В некоторых вариантах осуществления средство, ингибирующее активность mTOR, представляет собой малую органическую молекулу. В некоторых вариантах осуществления любого из предложенных способов средство, ингибирующее активность mTOR, ингибирует активность киназы mTORC1 и/или mTORC2. В конкретных вариантах осуществления любого из предложенных способов средство, ингибирующее активность mTOR, ингибирует активность по меньшей мере одной дополнительной киназы. В конкретных вариантах осуществления любого из предложенных способов по меньшей мере одна дополнительная киназа представляет собой PI3K. В некоторых вариантах осуществления любого из предложенных способов средство, ингибирующее активность mTOR, представляет собой BEZ235, BGT226, GDC0980, NVP-BEZ235, PF-04691502, PI-103, SAR245409, SF1126, VS5584 или XL765.

[0013] В конкретных вариантах осуществления любого из предложенных способов средство, ингибирующее активность mTOR: (i) не ингибирует активность PI3K; (ii) заметно не ингибирует активность PI3K при IC<sub>50</sub> для активности mTOR; и/или (iii) заметно не ингибирует PI3K при всех концентрациях, заметно ингибирующих активность mTOR. В конкретных вариантах осуществления любого из предложенных способов

средство, ингибирующее активность mTOR, ингибирует активность киназы mTORC1 и mTORC2. В некоторых вариантах осуществления любого из предложенных способов средство, ингибирующее активность mTOR, представляет собой пиразолопиримидин, торин 1, торкиниб, PP30, Ku-0063794, WAY-600 (Wyeth), WAY-687 (Wyeth), WAY-354 (Wyeth), OSI-027, DS3078a или AZD8055. В конкретных вариантах осуществления любого из предложенных способов средство, ингибирующее активность mTOR, избирательно ингибирует активность mTORC1.

[0014] В конкретных вариантах осуществления любого из предложенных способов средство, ингибирующее активность mTOR: (i) не ингибирует активность mTORC2; (ii) заметно не ингибирует активность mTORC2 при  $IC_{50}$  для активности mTORC1; и/или (iii) заметно не ингибирует mTORC2 при всех концентрациях, заметно ингибирующих активность mTORC1. В некоторых вариантах осуществления любого из предложенных способов средство, ингибирующее активность mTOR, представляет собой рапамицин, темсиролимус, эверолимус, дефоролимус или AZD8055.

[0015] В конкретных вариантах осуществления любого из предложенных способов средство имеет формулу, представленную формулой I,

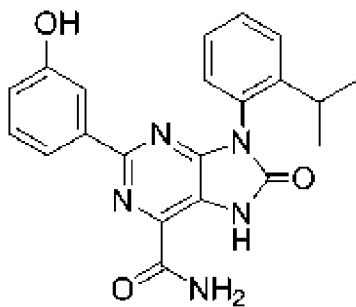


Формула (I)

где  $R^1$  представляет собой замещенный или незамещенный  $C_{1-8}$  алкил, замещенный или незамещенный арил, замещенный или незамещенный гетероарил, замещенный или незамещенный циклоалкил, или замещенный или незамещенный гетероциклоалкил,  $R^2$  представляет собой замещенный или незамещенный  $C_{1-8}$  алкил, замещенный или незамещенный арил, замещенный или незамещенный гетероарил, замещенный или незамещенный циклоалкил, или замещенный или незамещенный гетероциклоалкил, и  $R^3$  и  $R^4$  независимо представляют собой H или  $C_{1-8}$  алкил. В некоторых вариантах осуществления средство, ингибирующее активность mTOR, представляет собой или включает соединение формулы (I), или его фармацевтически приемлемую соль или сольват. В некоторых вариантах осуществления средство, ингибирующее активность mTOR, представляет собой или включает соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемую соль.

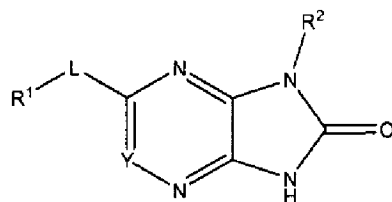
[0016] В конкретных вариантах осуществления любого из предложенных способов  $R^1$  представляет собой замещенный арил, замещенный или незамещенный гетероарил, такой как замещенный фенил. В некоторых вариантах осуществления любого из

предложенных способов  $R^2$  представляет собой замещенный или незамещенный арил и/или замещенный или незамещенный фенил. В некоторых вариантах осуществления  $R^2$  представляет собой замещенный или незамещенный арил, такой как замещенный или незамещенный фенил. В конкретных вариантах осуществления любого из предложенных способов группы, которые являются замещенными, замещены одним или более из групп галогена;  $C_{1-8}$  алкила;  $C_{2-8}$  алкенила;  $C_{2-8}$  алкинила; гидроксила;  $C_{1-8}$  алкоксила; amino; нитро; тиола; тиоэфира; имида; циано; амидо; фосфонато; фосфина; карбоксила; тиокарбонила; сульфонила; сульфонамида; кетона; альдегида; сложного эфира; карбонила; галоалкила;  $B(OH)_2$ ; карбоциклического циклоалкила, гетероциклоалкила, моноциклического или конденсированного, или не конденсированного полициклического арила или гетероарила; amino; *O*-низшего алкила; *O*-арила, арила; арила-низшего алкила;  $CO_2CH_3$ ;  $CONH_2$ ;  $OCH_2CONH_2$ ;  $NH_2$ ;  $SO_2NH_2$ ;  $OCHF_2$ ;  $CF_3$  или  $OCF_3$ . В конкретных вариантах осуществления любого из предложенных способов средство, ингибирующее активность mTOR, представляет собой соединение 63. В некоторых вариантах осуществления любого из предложенных способов средство, ингибирующее активность mTOR, представляет собой или включает 2-(3-гидроксифенил)-9-(2-изопропилфенил)-8-оксо-8,9-дигидро-7H-пурин-6-карбоксамид, или его фармацевтически приемлемую соль или сольват. В некоторых вариантах осуществления любого из предложенных способов средство, ингибирующее активность mTOR, представляет собой или включает



или его фармацевтически приемлемую соль.

[0017] В некоторых вариантах осуществления любого из предложенных способов средство имеет формулу, представленную формулой (II),



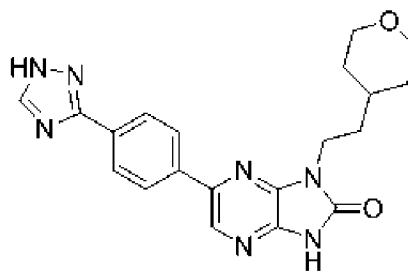
Формула (II)

где L представляет собой простую связь, NH или O, Y представляет собой N или  $CR^3$ , при этом  $R^1$  представляет собой H, замещенный или незамещенный  $C_{1-8}$  алкил, замещенный или незамещенный  $C_{2-8}$  алкенил, замещенный или незамещенный арил,

замещенный или незамещенный гетероарил, замещенный или незамещенный циклоалкил, или замещенный или незамещенный гетероциклоалкил,  $R^2$  представляет собой H, замещенный или незамещенный  $C_{1-8}$  алкил, замещенный или незамещенный арил, замещенный или незамещенный гетероарил, замещенный или незамещенный циклоалкил, или замещенный или незамещенный гетероциклоалкил,  $R^3$  представляет собой H, замещенный или незамещенный  $C_{1-8}$  алкил, замещенный или незамещенный арил, замещенный или незамещенный гетероарил, замещенный или незамещенный циклоалкил, замещенный или незамещенный гетероциклоалкил,  $-NHR^4$  или  $-N(R^4)_2$ , и  $R^4$  в каждом случае независимо представляет собой замещенный или незамещенный  $C_{1-8}$  алкил, замещенный или незамещенный арил, замещенный или незамещенный гетероарил, замещенный или незамещенный циклоалкил, или замещенный или незамещенный гетероциклоалкил. В некоторых вариантах осуществления средство, ингибирующее активность mTOR, представляет собой или включает соединение формулы (II), или его фармацевтически приемлемую соль или сольват. В некоторых вариантах осуществления средство, ингибирующее активность mTOR, представляет собой или включает соединение формулы (II) или его фармацевтически приемлемую соль.

[0018] В конкретных вариантах осуществления любого из предложенных способов  $R^1$  представляет собой замещенный арил и/или замещенный фенил. В некоторых вариантах осуществления любого из предложенных способов  $R^1$  представляет собой замещенный арил, такой как замещенный фенил. В конкретных вариантах осуществления любого из предложенных способов Y представляет собой СН. В некоторых вариантах осуществления любого из предложенных способов L представляет собой простую связь. В конкретных вариантах осуществления любого из предложенных способов  $R^1$  представляет собой замещенный арил и  $R^2$  представляет собой  $C_{1-8}$  алкил, замещенный одним или более заместителями, выбранными из алкокси, амина, гидроксид, циклоалкила или гетероциклоалкила. В конкретных вариантах осуществления любого из предложенных способов  $R^2$  представляет собой  $C_{1-8}$  алкил, замещенный одним или более из гетероциклоалкила. В некоторых вариантах осуществления любого из предложенных способов средство, ингибирующее активность mTOR, представляет собой соединение 155. В некоторых вариантах осуществления любого из предложенных способов средство, ингибирующее активность mTOR, представляет собой или включает 6-(4-(2H-1,2,4-триазол-3-ил)фенил)-1-(2-(тетрагидро-2H-пиран-4-ил)этил)-1H-имидазо[4,5-b]пиразин-2(3H)-он, или его фармацевтически приемлемую соль или сольват. В некоторых вариантах осуществления любого из предложенных способов средство, ингибирующее активность

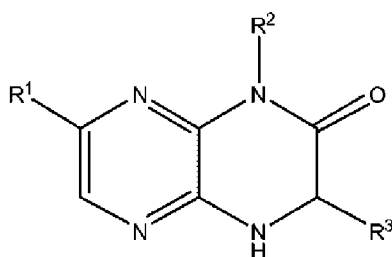




mTOR, представляет собой или включает фармацевтически приемлемую соль.

или его

[0019] В конкретных вариантах осуществления любого из предложенных способов средство имеет формулу, представленную формулой III



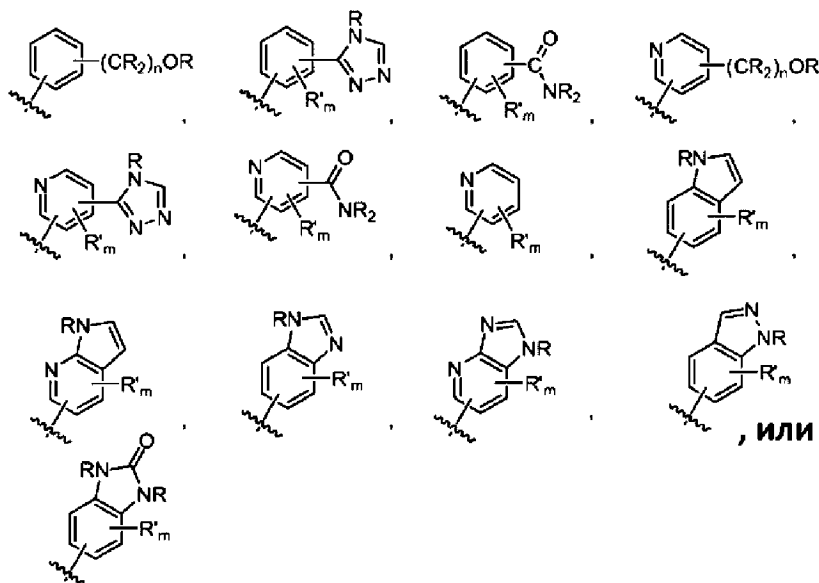
### Формула (III)

где  $R^1$  представляет собой замещенный или незамещенный  $C_{1-8}$  алкил, замещенный или незамещенный арил, замещенный или незамещенный циклоалкил, замещенный или незамещенный гетероцикл, или замещенный или незамещенный гетероциклилалкил,  $R^2$  представляет собой H, замещенный или незамещенный  $C_{1-8}$  алкил, замещенный или незамещенный циклоалкил, замещенный или незамещенный гетероцикл, замещенный или незамещенный гетероциклилалкил, замещенный или незамещенный аралкил, или замещенный или незамещенный циклоалкилалкил, и  $R^3$  представляет собой H, или замещенный или незамещенный  $C_{1-8}$  алкил. В конкретных вариантах осуществления любого из предложенных способов  $R^1$  представляет собой замещенный или незамещенный арил, или замещенный или незамещенный гетероарил. В некоторых вариантах осуществления любого из предложенных способов  $R^1$  представляет собой пиридил, который является замещенным. В некоторых вариантах осуществления средство, ингибирующее активность mTOR, представляет собой или включает соединение формулы (III), или его фармацевтически приемлемую соль или сольват. В некоторых вариантах осуществления средство, ингибирующее активность mTOR, представляет собой или включает соединение формулы (III) или его фармацевтически приемлемую соль.

[0020] В конкретных вариантах осуществления любого из предложенных способов  $R^1$  представляет собой пиридил, замещенный одним или более заместителями, независимо выбранными из группы, состоящей из замещенного или незамещенного  $C_{1-8}$  алкила, замещенного или незамещенного гетероцикла (галогена, аминокарбонила, циано, гидроксильного, -OR и -NR<sub>2</sub>, где каждый R независимо представляет собой H, или замещенный или незамещенный  $C_{1-4}$  алкил. В конкретных вариантах осуществления  $R^1$  представляет собой 1H-пирроло[2,3-b]пиридил или бензимидазол, необязательно

замещенный одним или более заместителями, независимо выбранными из группы, состоящей из замещенного или незамещенного  $C_{1-8}$  алкила и  $-NR_2$ , где R независимо представляет собой H, или замещенный или незамещенный  $C_{1-4}$  алкил.

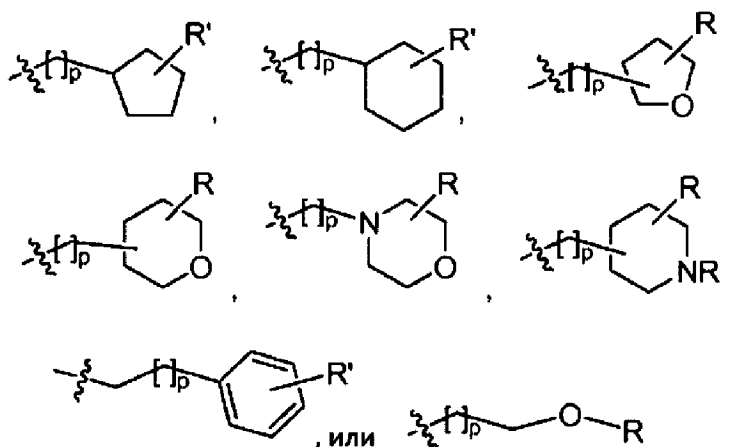
[0021] В некоторых вариантах осуществления любого из предложенных способов  $R^1$  представляет собой



где R в каждом случае независимо представляет собой H, или замещенный или незамещенный  $C_{1-4}$  алкил (например, метил);  $R^1$  в каждом случае независимо представляет собой замещенный или незамещенный  $C_{1-4}$  алкил, галоген, циано,  $-OR$  или  $-NR_2$ ; m равно 0-3 и n равно 0-3.

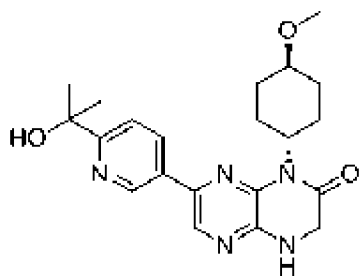
[0022] В конкретных вариантах осуществления любого из предложенных способов  $R^2$  представляет собой H, метил, этил, н-пропил, изопропил, н-бутил, втор-бутил, изобутил, трет-бутил, н-пентил, изопентил, циклопентил, циклогексил, тетрагидрофуранил, тетрагидропиранил,  $(C_{1-4}$  алкил)фенил,  $(C_{1-4}$  алкил)циклопропил,  $(C_{1-4}$  алкил)циклобутил,  $(C_{1-4}$  алкил)циклопентил,  $(C_{1-4}$  алкил)циклогексил,  $(C_{1-4}$  алкил)пирролидил,  $(C_{1-4}$  алкил)пиперидил,  $(C_{1-4}$  алкил)пиперазинил,  $(C_{1-4}$  алкил)морфолинил,  $(C_{1-4}$  алкил)тетрагидрофуранил или  $(C_{1-4}$  алкил)тетрагидропиранил, каждый, необязательно, замещенный.

[0023] В конкретных вариантах осуществления любого из предложенных способов  $R^2$  представляет собой H,  $C_{1-4}$  алкил,  $(C_{1-4}$  алкил)(OR),



где R в каждом случае независимо представляет собой H, или замещенный или незамещенный C<sub>1-8</sub> алкил, R' в каждом случае независимо представляет собой H, -OR, циано, или замещенный или незамещенный C<sub>1-8</sub> алкил, и p равно 0-3.

[0024] В некоторых вариантах осуществления любого из предложенных способов средство, ингибирующее активность mTOR, представляет собой соединение 246. В некоторых вариантах осуществления любого из предложенных способов средство, ингибирующее активность mTOR, представляет собой или включает 7-(6-(2-гидроксипропан-2-ил)пиридин-3-ил)-1-((1r,4r)-4-метоксициклогексил)-3,4-дигидропиразино[2,3-b]пиазин-2(1H)-он, или его фармацевтически приемлемую соль или сольват. В некоторых вариантах осуществления любого из предложенных способов средство, ингибирующее активность mTOR, представляет собой или включает



или его фармацевтически приемлемую соль.

[0025] В настоящем документе предложен способ получения композиции генетически модифицированных клеток, включающий культивирование в присутствии средства, ингибирующего активность mTOR, композиции генетически модифицированных клеток, содержащей обогащенные первичные человеческие Т-клетки, включающие Т-клетки, генетически модифицированные рекомбинантным рецептором; при этом средство, ингибирующее активность mTOR, представляет собой соединение 63, соединение 155 или соединение 246; и при этом способ приводит к пролиферации или размножению клеток в композиции, с получением произведенной композиции, содержащей генетически модифицированные Т-клетки.

[0026] В конкретных вариантах осуществления любого из предложенных способов композицию генетически модифицированных клеток культивируют в присутствии

соединения 63 в концентрации от 500 нМ до 2 мкМ, от 1 нМ до 100 нМ, от 50 нМ до 250 нМ или от 100 нМ до 500 нМ. В конкретных вариантах осуществления любого из предложенных способов композицию генетически модифицированных клеток культивируют в присутствии соединения 155 в концентрации от 500 нМ до 2 мкМ, от 1 нМ до 100 нМ, от 50 нМ до 250 нМ или от 100 нМ до 500 нМ. В некоторых вариантах осуществления любого из предложенных способов композицию генетически модифицированных клеток культивируют в присутствии соединения 246 в концентрации от 500 нМ до 2 мкМ, от 1 нМ до 100 нМ, от 50 нМ до 250 нМ или от 100 нМ до 500 нМ.

[0027] В конкретных вариантах осуществления любого из предложенных способов до культивирования способ дополнительно включает: (а) инкубирование в стимулирующих условиях исходной композиции, содержащей первичные Т-клетки, в присутствии средства, ингибирующего активность mTOR; при этом указанные стимулирующие условия включают присутствие 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, с получением стимулированной композиции; и при этом средство, ингибирующее активность mTOR, представляет собой соединение 63, соединение 155 или соединение 246; и (b) введение рекомбинантного рецептора в стимулированную композицию, с получением генетически модифицированной композиции, содержащей генетически модифицированные Т-клетки.

[0028] В настоящем документе предложен способ получения композиции генетически модифицированных клеток, включающий: (а) инкубирование в стимулирующих условиях исходной композиции, содержащей первичные человеческие Т-клетки, при этом 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) средства, ингибирующего активность mTOR, при этом средство, ингибирующее активность mTOR, представляет собой соединение 63, соединение 155 или соединение 246; и (b) введение рекомбинантного рецептора в стимулированную композицию, с получением генетически модифицированной композиции, содержащей генетически модифицированные Т-клетки. В некоторых вариантах осуществления первичные Т-клетки обогащены по CD4+ и/или CD8+ Т-клеткам.

[0029] В конкретных вариантах осуществления любого из предложенных способов стимулирующий реагент включает первичное средство, которое специфически связывает компонент комплекса TCR, необязательно, которое специфически связывает CD3. В некоторых вариантах осуществления любого из предложенных способов стимулирующий реагент также включает вторичное средство, которое специфически связывает Т-клеточную костимулирующую молекулу, необязательно, при этом костимулирующую молекулу выбирают из CD28, CD137 (4-1-BB), OX40 или ICOS. В конкретных вариантах

осуществления любого из предложенных способов первичное и/или вторичное средства включают антитело, необязательно, при этом использование стимулирующего реагента включает инкубацию с анти-CD3 антителом и анти-CD28 антителом, или их антигенсвязывающими фрагментами. В конкретных вариантах осуществления любого из предложенных способов первичное средство и/или вторичное средство находятся на поверхности твердой подложки. В некоторых вариантах осуществления любого из предложенных способов твердая подложка представляет собой или включает гранулу. В конкретных вариантах осуществления любого из предложенных способов гранула имеет диаметр более или более примерно 3,5 мкм, но не более примерно 9 мкм или не более примерно 8 мкм, или не более примерно 7 мкм, или не более примерно 6 мкм, или не более примерно 5 мкм. В конкретных вариантах осуществления любого из предложенных способов гранула имеет диаметр примерно 4,5 мкм. В некоторых вариантах осуществления любого из предложенных способов гранула является инертной. В конкретных вариантах осуществления любого из предложенных способов гранула представляет собой или имеет полистирольную поверхность. В конкретных вариантах осуществления любого из предложенных способов гранула является магнитной или суперпарамагнитной. В некоторых вариантах осуществления любого из предложенных способов соотношение гранул и клеток составляет от или от примерно 4:1 до 0,25:1.

[0030] В конкретных вариантах осуществления любого из предложенных способов введение включает трансдукцию клеток стимулированной композиции вирусным вектором, содержащим полинуклеотид, кодирующий рекомбинантный рецептор. В конкретных вариантах осуществления любого из предложенных способов вирусный вектор представляет собой ретровирусный вектор. В некоторых вариантах осуществления любого из предложенных способов вирусный вектор представляет собой лентивирусный вектор или гамма-ретровирусный вектор. В конкретных вариантах осуществления любого из предложенных способов введение включает трансфекцию клеток стимулированной композиции вектором, содержащим полинуклеотид, кодирующий рекомбинантный рецептор. В конкретных вариантах осуществления любого из предложенных способов вектор представляет собой транспозон, необязательно, транспозон «спящая красавица» (SB) или транспозон Piggybac.

[0031] В некоторых вариантах осуществления предложенных способов после культивирования способ дополнительно включает сбор клеток произведенной композиции. Конкретные варианты осуществления любого из предложенных способов также включают формулирование клеток произведенной композиции для криоконсервации и/или введения субъекту, необязательно, в присутствии фармацевтически приемлемого эксципиента. В конкретных вариантах осуществления любого из предложенных способов клетки произведенной композиции формулируют в присутствии криопротектора. В некоторых вариантах осуществления любого из предложенных способов криопротектор включает ДМСО. В конкретных вариантах осуществления любого из предложенных способов клетки произведенной композиции

формулируют в контейнере, необязательно, флаконе или мешке.

[0032] Некоторые варианты осуществления предложенных способов также включают выделение CD4<sup>+</sup> и/или CD8<sup>+</sup> Т-клеток из биологического образца перед инкубацией. В некоторых вариантах осуществления любого из предложенных способов выделение включает селекцию клеток на основе поверхностной экспрессии CD4 и/или CD8, необязательно, методом положительной или отрицательной селекции. В конкретных вариантах осуществления любого из предложенных способов выделение включает проведение основанной на иммунной аффинности селекции. В конкретных вариантах осуществления любого из предложенных способов биологический образец содержит первичные Т-клетки, полученные от субъекта. В некоторых вариантах осуществления любого из предложенных способов биологический образец представляет собой или включает образец цельной крови, образец лейкоцитарной пленки, образец мононуклеарных клеток периферической крови (МКПК), образец не фракционированных Т-клеток, образец лимфоцитов, образец белых клеток крови, продукт афереза или продукт лейкофереза.

[0033] В конкретных вариантах осуществления любого из предложенных способов рекомбинантный рецептор способен связывать антиген-мишень, который связан с, специфичен для, и/или экспрессируется на клетке или ткани, связанной с заболеванием, нарушением или состоянием. В конкретных вариантах осуществления любого из предложенных способов заболевание, нарушение или состояние представляет собой инфекционное заболевание или нарушение, аутоиммунное заболевание, воспалительное заболевание, либо опухоль или рак. В некоторых вариантах осуществления любого из предложенных способов антиген-мишень представляет собой опухолевый антиген.

[0034] В конкретных вариантах осуществления любого из предложенных способов антиген-мишень выбирают из 5T4, 8H9, интегрина  $\alpha v \beta 6$ , B7-H6, антигена созревания В-клеток (BCMA), CA9, раково-тестикулярного антигена, карбоангидразы 9 (CAIX), CCL-1, CD19, CD20, CD22, SEA, поверхностного антигена вируса гепатита В, CD23, CD24, CD30, CD33, CD38, CD44, CD44v6, CD44v7/8, CD123, CD138, CD171, карциноэмбрионального антигена (CEA), CE7, циклина, циклина A2, c-Met, двойного антигена, EGFR, эпителиального гликопротеина 2 (EPG-2), эпителиального гликопротеина 40 (EPG-40), ERNa2, эфрина B2, erb-B2, erb-B3, erb-B4, димеров erbB, EGFR vIII, рецептора эстрогена, эмбрионального AchR, фолатного рецептора альфа, фолат-связывающего белка (FBP), FCRL5, FCRH5, эмбрионального ацетилхолинового рецептора, G250/CAIX, GD2, GD3, связанного с G-белками рецептора 5D (GPCR5D), gp100, Her2/neu (рецептора тирозинкиназы erbB2), HMW-MAA, IL-22R-альфа, IL-13 рецептора альфа 2 (IL-13Ra2), рецептора домена киназной вставки (kdr), легкой цепи каппа, Lewis Y, L1-молекулы клеточной адгезии (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), онкоэмбрионального антигена, предпочтительно экспрессируемого антигена меланомы

(PRAME), PSCA, рецептора прогестерона, сурвивина, ROR1, TAG72, tEGFR, рецепторов VEGF, VEGF-R2, антигена опухоли Вильмса 1 (WT-1), специфического для патогена антигена и антигена, связанного с универсальным маркером.

[0035] В конкретных вариантах осуществления любого из предложенных способов рекомбинантный рецептор представляет собой или включает функциональный не-TCR антигенный рецептор, либо TCR или его антигенсвязывающий фрагмент. В некоторых вариантах осуществления любого из предложенных способов рекомбинантный рецептор представляет собой химерный антигенный рецептор (CAR). В конкретных вариантах осуществления любого из предложенных способов рекомбинантный рецептор представляет собой анти-CD19 CAR. В конкретных вариантах осуществления любого из предложенных способов химерный антигенный рецептор содержит внеклеточный домен, содержащий антигенсвязывающий домен.

[0036] В некоторых вариантах осуществления любого из предложенных способов антигенсвязывающий домен представляет собой или включает антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, который, необязательно, представляет собой одноцепочечный фрагмент. В конкретных вариантах осуществления любого из предложенных способов фрагмент содержит переменные области антитела, соединенные гибким линкером. В конкретных вариантах осуществления любого из предложенных способов фрагмент представляет собой scFv. В некоторых вариантах осуществления любого из предложенных способов химерный антигенный рецептор дополнительно содержит спейсер и/или шарнирную область. В конкретных вариантах осуществления любого из предложенных способов химерный антигенный рецептор содержит внутриклеточную сигнальную область. В конкретных вариантах осуществления любого из предложенных способов внутриклеточная сигнальная область содержит внутриклеточный сигнальный домен. В некоторых вариантах осуществления любого из предложенных способов внутриклеточный сигнальный домен представляет собой или включает основной сигнальный домен, сигнальный домен, способный индуцировать основной сигнал активации в Т-клетке, сигнальный домен компонента Т-клеточного рецептора (TCR) и/или сигнальный домен, содержащий иммунорецепторный тирозиновый активирующий мотив (ITAM). В конкретных вариантах осуществления любого из предложенных способов внутриклеточный сигнальный домен представляет собой или включает внутриклеточный сигнальный домен цепи CD3, необязательно, дзета-цепи CD3 (CD3 $\zeta$ ), или его сигнальный фрагмент.

[0037] В конкретных вариантах осуществления любого из предложенных способов химерный антигенный рецептор дополнительно содержит трансмембранный домен, расположенный между внеклеточным доменом и внутриклеточной сигнальной областью. В некоторых вариантах осуществления любого из предложенных способов внутриклеточная сигнальная область дополнительно содержит костимулирующую сигнальную область. В конкретных вариантах осуществления любого из предложенных способов костимулирующая сигнальная область содержит внутриклеточный сигнальный

домен Т-клеточной костимулирующей молекулы или его сигнальный фрагмент. В конкретных вариантах осуществления любого из предложенных способов костимулирующая сигнальная область содержит внутриклеточный сигнальный домен CD28, 4-1BB или ICOS, или его сигнальный фрагмент. В некоторых вариантах осуществления любого из предложенных способов костимулирующая сигнальная область расположена между трансмембранным доменом и внутриклеточной сигнальной областью.

[0038] В конкретных вариантах осуществления любого из предложенных способов первичные Т-клетки включают отдельные композиции обогащенных CD4<sup>+</sup> Т-клеток и обогащенных CD8<sup>+</sup> Т-клеток, и при этом композиции обогащенных CD4<sup>+</sup> Т-клеток и обогащенных CD8<sup>+</sup> Т-клеток культивируют отдельно. В конкретных вариантах осуществления любого из предложенных способов первичные Т-клетки включают отдельные композиции обогащенных CD4<sup>+</sup> Т-клеток и обогащенных CD8<sup>+</sup> Т-клеток, и при этом композиции смешивают и культивируют обогащенные CD4<sup>+</sup> Т-клетки и обогащенные CD8<sup>+</sup> Т-клетки совместно.

[0039] В настоящем документе предложена композиция, содержащая генетически модифицированные клетки, полученные любым из способов, предложенных в настоящем документе. В конкретных вариантах осуществления композиция также содержит фармацевтически приемлемый носитель. В некоторых вариантах осуществления композиция содержит криопротектор, необязательно, ДМСО.

[0040] В настоящем документе предложено изделие, включающее любую композицию, предложенную в настоящем документе, и инструкции по введению произведенной композиции субъекту. В конкретных вариантах осуществления субъект имеет заболевание или состояние, необязательно, при этом рекомбинантный рецептор специфически узнает или специфически связывает антиген, связанный с, или экспрессируемый, или присутствующий на клетках, связанных с заболеванием или состоянием. В конкретных вариантах осуществления произведенная композиция представляет собой композицию генетически модифицированных CD4<sup>+</sup> Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления произведенная композиция представляет собой композицию генетически модифицированных CD8<sup>+</sup> Т-клеток. В конкретных вариантах осуществления произведенная композиция представляет собой композицию генетически модифицированных CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-клеток.

[0041] В настоящем документе предложено изделие, включающее композицию генетически модифицированных CD4<sup>+</sup> Т-клеток, полученную способом, предложенным в настоящем документе, композицию генетически модифицированных CD8<sup>+</sup> Т-клеток, полученную способом, предложенным в настоящем документе, и инструкции по введению генетически модифицированных CD4<sup>+</sup> Т-клеток и генетически модифицированных CD8<sup>+</sup> Т-клеток субъекту. В конкретных вариантах осуществления инструкции конкретно указывают на отдельное введение CD4<sup>+</sup> Т-клеток и CD8<sup>+</sup> Т-клеток субъекту. В конкретных вариантах осуществления инструкции конкретно указывают на введение CD4<sup>+</sup> Т-клеток и CD8<sup>+</sup> Т-клеток субъекту в нужном соотношении. В настоящем



документе также предложено изделие, включающее композицию генетически модифицированных CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-клеток, полученную способом, предложенным в настоящем документе, и инструкции по введению генетически модифицированных CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-клеток субъекту.

[0042] В настоящем документе предложен способ долгосрочной стимуляции для оценки клеточной композиции, включающий инкубирование в течение периода времени по меньшей мере 10 дней исходной композиции в условиях, стимулирующих CAR-зависимую активность в клетках исходной композиции, при этом указанная исходная композиция содержит Т-клетки, экспрессирующие химерный антигенный рецептор (CAR), содержащий внеклеточный антигенсвязывающий домен, который специфически связывает или узнает антиген, с получением произведенной композиции; и оценку одного или более фенотипов или активности одной или более клеток произведенной композиции.

[0043] В некоторых вариантах осуществления способа долгосрочной стимуляции условия, стимулирующие CAR-зависимую активность, включают присутствие связывающей молекулы, которая специфически связывает антигенсвязывающий домен CAR. В некоторых вариантах осуществления связывающая молекула связана с подложкой. В некоторых вариантах осуществления подложка представляет собой твердую подложку. В некоторых вариантах осуществления твердая подложка представляет собой поверхность лунки микропланшета или гранулу. В некоторых вариантах осуществления твердая подложка представляет собой микропланшет, связывающая молекула связана с микропланшетом, и инкубацию проводят в микропланшете. В некоторых вариантах осуществления твердая подложка представляет собой гранулу, с которой связана связывающая молекула, и инкубацию проводят в присутствии множества гранул.

[0044] В некоторых вариантах осуществления способа долгосрочной стимуляции связывающая молекула представляет собой или включает рекомбинантный антиген, или его фрагмент, узнаваемый антигенсвязывающим доменом. В некоторых вариантах осуществления рекомбинантный антиген, или его фрагмент, представляет собой ВСМА, или его фрагмент, узнаваемый антигенсвязывающим доменом. В некоторых вариантах осуществления связывающая молекула представляет собой или включает антиидиотипическое антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, которое специфически связывает антигенсвязывающий домен. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен антигенного рецептора представляет собой или включает антитело SJ25C1, или его антигенсвязывающий фрагмент. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен антигенного рецептора представляет собой или включает антитело FMC63, или его антигенсвязывающий фрагмент.

[0045] В некоторых из вариантов осуществления способа долгосрочной стимуляции способ осуществляют *in vitro* или *ex vivo*.

[0046] В некоторых из вариантов осуществления способа долгосрочной стимуляции исходную композицию инкубируют в присутствии среды, которая не

содержит рекомбинантные цитокины. В некоторых вариантах осуществления инкубацию проводят постоянно, или не прерывают на определенный период времени. В некоторых вариантах осуществления в процессе инкубации клетки не пересевают, среду не заменяют и связывающую молекулу не добавляют.

[0047] В некоторых из вариантов осуществления способа долгосрочной стимуляции способ включает оценку одного или более фенотипов активации, истощения или состояния дифференциации одной или более клеток произведенной композиции. В некоторых вариантах осуществления фенотип соответствует истощению, и оценка включает измерение экспрессии, необязательно, поверхностной экспрессии, одного или более маркеров, выбранных из CTLA-4, FOXP3, PD-1, TIGIT, LAB-3, 2B4, BTLA, TIM3, VISTA или CD96. В некоторых вариантах осуществления фенотип соответствует активации, и оценка включает измерение экспрессии, необязательно, поверхностной экспрессии, одного или более маркеров, выбранных из CD25, CD26, CD27, CD28, CD30, CD71, CD154, CD40L, CD127, LAG3 или Ki67. В некоторых вариантах осуществления фенотип соответствует состоянию дифференциации, и оценка включает измерение одного или более маркеров, выбранных из (i) одного или более из CD25, CD45RO, CD56, KLRG1, CD95 и/или (ii) одного или более из CD45RA, CD27, CD28, CD62L и CCR7, необязательно, при этом один или более маркеров представляют собой маркеры, положительно или отрицательно связанные с подобными наивным Т-клетками.

[0048] В некоторых из вариантов осуществления способа долгосрочной стимуляции способ включает оценку одной или более активностей одной или более клеток произведенной композиции. В некоторых вариантах осуществления одна или более активностей включают CAR-зависимую активность, необязательно, антиген-стимулированную активность. В некоторых вариантах осуществления одна или более активностей включают цитолитическую активность или продуцирование цитокинов.

[0049] В некоторых из вариантов осуществления способа долгосрочной стимуляции период времени составляет по меньшей мере или по меньшей мере примерно 11 дней, 12 дней, 13 дней, 14 дней или 15 дней. В некоторых вариантах осуществления период времени составляет или составляет примерно 11 дней, 12 дней, 13 дней, 14 дней или 15 дней.

[0050] В некоторых из вариантов осуществления способа долгосрочной стимуляции исходная композиция содержит клетки, которые были подвергнуты воздействию, или контактировали с тестируемым средством или соединением перед инкубацией, необязательно, при этом воздействие или контактирование проводят в течение одного или более этапов способа получения исходной композиции, содержащей Т-клетки, экспрессирующие CAR. В некоторых вариантах осуществления способ применяют к множеству исходных композиций, при этом все из множества указанных исходных композиций получают разными способами.

[0051] В некоторых из вариантов осуществления способа долгосрочной стимуляции способ дополнительно включает сравнение фенотипа или активности

произведенной композиции с фенотипом или активностью контрольной композиции, необязательно, при этом контрольная композиция представляет собой композицию Т-клеток, которые были инкубированы в течение по меньшей мере 10 дней в тех же условиях, стимулирующих CAR-зависимую активность, при этом указанная композиция Т-клеток не была получена в присутствии тестируемого средства или соединения, или была получена иным способом, чем исходная композиция. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает идентификацию произведенной композиции, проявляющей менее выраженное истощение, меньшую активацию или менее выраженную дифференциацию, в сравнении с контрольными композициями. В некоторых вариантах осуществления менее выраженная дифференциация включает повышенную экспрессию одного или более маркеров подобных наивным Т-клеток.

#### КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

[0052] На ФИГ. 1A-1D представлены графики, показывающие уровни фосфорилированного S6, определенные в CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-клетках, инкубированных с конъюгированными с анти-CD3 и анти-CD28 антителом магнитными гранулами в присутствии разных концентраций PI-103 (ФИГ. 1A), соединения 155 (ФИГ. 1B), соединения 246 (ФИГ. 1C) или соединения 63 (ФИГ. 1D).

[0053] На ФИГ. 2 представлены графики, показывающие процентную долю от исходного количества клеток для генетически модифицированных CD8<sup>+</sup> (верхняя панель) и CD4<sup>+</sup> (нижняя панель) Т-клеток, которые присутствуют после инкубации в контроле, содержащем только среду, или в присутствии ДМСО, PI-103 или разных концентраций соединения 155, соединения 63 или соединения 246. Стрелками указана максимальная переносимая доза соединения 155, соединения 63 и соединения 246, которая приводила к аналогичным уровням размножения CD8<sup>+</sup> и CD4<sup>+</sup> Т-клеток. Пунктирные горизонтальные уровни соответствуют 70% от средних значений для контролей со средой и ДМСО.

[0054] На ФИГ. 3A-3C представлены графики клеточного гликолитического метаболизма в CD8<sup>+</sup> Т-клетках в полученной анти-CD19 CAR-Т-клеточной композиции. На ФИГ. 3A представлены графики, показывающие скорость внеклеточного закисления (ECAR) в реальном времени для CD8<sup>+</sup> CAR-Т-клеток среди анти-CD19 CAR-Т-клеток, полученных путем размножения в присутствии только среды, ДМСО, PI-103 или соединения 63. На ФИГ. 3B показана площадь под кривой (AUC), рассчитанная для скоростей ECAR (мрН/мин) относительно контролей, содержащих только среду. На ФИГ. 3C показан максимальный коэффициент гликолитического «взрыва» ECAR относительно контролей, содержащих только среду.

[0055] На ФИГ. 4A-4B представлены графики, показывающие результаты анализов, проведенных с анти-CD19 CAR-Т-клеточными композициями, которые были получены путем размножения в присутствии только среды, ДМСО, PI-103 или соединения 63. На ФИГ. 4A показана средняя интенсивность флуоресценции при окрашивании фосфо-S6 CD8<sup>+</sup> и CD4<sup>+</sup> Т-клеток полученных анти-CD19 CAR-Т-клеточных композиций после совместного культивирования с облученными клетками К-562, трансдуцированными для

экспрессии CD19 (облученные клетки-мишени K562-CD19), и клеток, не подвергнутых воздействию антигена (без стимуляции). На верхних панелях представлены отдельные точки данных, полученных в отдельных клеточных композициях. На нижних панелях представлены средние значения  $\pm$  стандартное отклонение. На ФИГ. 4В представлены графики, показывающие цитолитическую активность полученных CAR-T-клеточных композиций, совместно культивируемых с клетками-мишенями K562-CD19 при соотношении эффекторных клеток и клеток-мишеней, составляющем 3:1 или 1:1. Результаты измерений для полученных CAR-T-клеточных композиций и экспрессирующих CD19 клеток K562 приведены в качестве контроля.

[0056] На ФИГ. 5 приведены графики, показывающие секрецию TNF-альфа (левая панель), IFN-гамма (средняя панель) и IL-2 (правая панель) в анти-CD19 CAR-T-клеточных композициях, которые были совместно культивированы с облученными клетками-мишенями K562-CD19. Показана кратность изменения продуцирования цитокинов, наблюдаемая в супернатантах после совместного культивирования полученных анти-CD19 CAR-T-клеточных композиций, размноженных в присутствии PI-103, соединения 63 или носителя ДМСО, в сравнении с клетками, размноженными только в среде.

[0057] На ФИГ. 6А и 6В представлены графики, показывающие полифункциональные цитокиновые профили CD8<sup>+</sup> (ФИГ. 6А) и CD4<sup>+</sup> (ФИГ. 6В) Т-клеток из полученных анти-CD19 CAR-T-клеточных композиций, которые были совместно культивированы с облученными клетками-мишенями K562-CD19, а затем дополнительно инкубированы с РМА/иономицином (левые панели) или ингибитором аппарата Гольджи (правые панели). Показана повышенная частота встречаемости клеток, положительно окрашенных на разные сочетания CD107 $\alpha$ , IFN-гамма (IFN $\gamma$ ), IL-2, IL-17a и TNF-альфа (TNF $\alpha$ ), в полученных анти-CD19 CAR-T-клеточных композициях, размноженных в присутствии PI-103, соединения 63 или носителя ДМСО, в сравнении с клетками, размноженными только в среде.

[0058] На ФИГ. 7А-7D представлены графики, показывающие активность Т-клеток из полученных анти-CD19 CAR-T-клеточных композиций, которые были размножены в присутствии только среды, ДМСО, PI-103 или соединения 63, после повторных стимуляций. На ФИГ. 7А показано удвоение популяции Т-клеток из полученных анти-CD19 CAR-T-клеточных композиций, совместно культивированных с облученными клетками-мишенями K562-CD19. После 4 раундов повторной стимуляции Т-клетки повторно культивировали без клеток-мишеней в день 11. На ФИГ. 7В представлена площадь под кривой (AUC), рассчитанная для удвоений популяции, относительно контролей, содержащих только среду. На ФИГ. 7С представлен график, показывающий продуцирование TNF-альфа (TNF), IFN-гамма (IFN $\gamma$ ) и IL-2 Т-клетками из полученных анти-CD19 CAR-T-клеточных композиций после стимуляции путем 16-часового совместного культивирования с облученными клетками-мишенями K562-CD19, после 4 раундов повторных стимуляций облученными клетками-мишенями K562-CD19. Показана

кратность изменения внеклеточных уровней TNF-альфа (TNF), IFN-гамма (IFN $\gamma$ ) и IL-2 в сравнении с условиями культивирования только в среде. На ФИГ. 7D представлены графики, показывающие полифункциональные цитокиновые профили CD8<sup>+</sup> Т-клеток из полученных анти-CD19 CAR-Т-клеточных композиций после 4 раундов повторной стимуляции облученными клетками-мишенями K562-CD19.

[0059] На ФИГ. 8A-8D представлены графики, показывающие активность Т-клеток из полученных анти-CD19 CAR-Т-клеточных композиций, которые были размножены в присутствии только среды, ДМСО, PI-103 или соединения 63, после стимуляции гранулами, конъюгированными на поверхности с антиидиотипическим антителом, специфическим для анти-CD19 CAR. На ФИГ. 8A показаны общие количества на лунку живых Т-клеток из полученных анти-CD19 CAR-Т-клеточных композиций, совместно культивированных с гранулами, конъюгированными на поверхности с антиидиотипическим антителом. На ФИГ. 8B показана площадь под кривой (AUC), рассчитанная для количества живых Т-клеток, в сравнении с контролями, полученными только в среде. На ФИГ. 8C представлен график, показывающий продуцирование TNF-альфа (TNF), IFN-гамма (IFN $\gamma$ ) и IL-2 Т-клетками из полученных анти-CD19 CAR-Т-клеточных композиций после стимуляции путем 16-часового совместного культивирования с облученными клетками-мишенями K562-CD19, после 15-дневной инкубации с гранулами, конъюгированными на поверхности с антиидиотипическим антителом. Показана кратность изменения внеклеточных уровней TNF-альфа (TNF), IFN-гамма (IFN $\gamma$ ) и IL-2 в сравнении с условиями, в которых использовали только среду. На ФИГ. 8D представлены графики, показывающие полифункциональные цитокиновые профили CD8<sup>+</sup> Т-клеток из полученных анти-CD19 CAR-Т-клеточных композиций после 15-дневной инкубации с гранулами, конъюгированными с антиидиотипическим антителом.

[0060] На ФИГ. 9A-9C представлены графики, показывающие результаты РНК-сек анализа CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-клеток из полученных анти-CD19 CAR-Т-клеточных композиций, которые были размножены в присутствии только среды, ДМСО, PI-103 или соединения 63. На ФИГ. 9A представлены вулканные диаграммы, показывающие дифференциальную экспрессию генов в CD4<sup>+</sup> (левые панели), CD8<sup>+</sup> (средние панели) и объединенных CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> (правые панели) Т-клетках из полученных анти-CD19 CAR-Т-клеточных композиций. Дифференциальная экспрессия генов показана для Т-клеток, размноженных только в среде (верхний ряд), с PI-103 (средний ряд) и с соединением 63 (нижний ряд), в сравнении с Т-клетками, размноженными с ДМСО. На ФИГ. 9B представлен график, показывающий log<sub>2</sub> кратности изменения (Log<sub>2</sub> КИ) дифференциальной экспрессии генов, измеренной в Т-клетках из полученных анти-CD19 CAR-Т-клеточных композиций, которые были размножены в присутствии PI-103 (ось X) и соединения 63 (ось Y), в сравнении с экспрессией в Т-клетках из полученных анти-CD19 CAR-Т-клеточных композиций, которые были размножены в присутствии ДМСО. На ФИГ. 9C представлена таблица и график, показывающие иллюстративные идентифицированные категории

генной онтологии (ГО) и их соответствующие Z-показатели.

[0061] На ФИГ. 10А и 10В представлены графики, показывающие опухолевую нагрузку и выживаемость мышей с опухолями после лечения анти-CD19 CAR-T-клетками. На ФИГ. 10А представлены графики, показывающие опухолевую нагрузку и выживаемость до дня 80 у мышей с опухолями после лечения анти-CD19 CAR-T-клетками. На ФИГ. 10В представлен график, показывающий выживаемость до дня 100 у мышей с опухолями после лечения анти-CD19 CAR-T-клетками. Иммунодефицитным мышам Nod scid gamma (NSG) имплантировали клетки Raji, экспрессирующие люциферазу светляков, и мыши либо не получали лечение, либо получали лечение высокой (левые панели) или низкой (правые панели) дозой анти-CD19 CAR-T-клеток, которые были размножены в присутствии ДМСО или PI-103. Опухолевая нагрузка у отдельных мышей, измеренная на основе биолюминесценции (верхние панели), и кривые выживаемости в группах лечения (нижние панели) показаны в указанные моменты времени на ФИГ. 10А и 10В.

[0062] На ФИГ. 11А и 11В представлены графики, показывающие опухолевую нагрузку и выживаемость у мышей с опухолями после лечения анти-CD19 CAR-T-клетками. На ФИГ. 11А представлены графики, показывающие опухолевую нагрузку и выживаемость до дня 80 у мышей с опухолями после лечения анти-CD19 CAR-T-клетками. На ФИГ. 11В представлен график, показывающий выживаемость до дня 100 у мышей с опухолями после лечения анти-CD19 CAR-T-клетками. Иммунодефицитным мышам NSG имплантировали клетки Raji, экспрессирующие люциферазу светляков, и мыши либо не получали лечение, либо получали лечение высокой (левые панели) или низкой (правые панели) дозой анти-CD19 CAR-T-клеток, которые были размножены в присутствии ДМСО или соединения 63. Опухолевая нагрузка у отдельных мышей, измеренная на основе биолюминесценции (верхние панели), и кривые выживаемости в группах лечения (нижние панели) показаны в указанные моменты времени на ФИГ. 11А и 11В.

[0063] На ФИГ. 12А и 12В представлены графики, показывающие активность Т-клеточных композиций, содержащих анти-CD19 CAR+ Т-клетки. Клетки либо инкубировали с гранулами, конъюгированными с анти-CD19 анти-ID антителом, в течение 14 дней (день 14; вторичная), либо не инкубировали перед проведением оценки активности. Показаны результаты анализа цитотоксичности (ФИГ. 12А) и анализа внутреннего окрашивания на цитокины (ICS) после воздействия экспрессирующих CD19 клеток (ФИГ. 12В).

[0064] На ФИГ. 13А-13С представлены графики, показывающие характеристики Т-клеточных композиций, содержащих анти-CD19 CAR+ Т-клетки, в процессе или после инкубации с гранулами, конъюгированными с анти-CD19 анти-ID антителом, в течение 14 дней. Показаны результаты для Т-клеточных композиций, полученных в присутствии PI-103, соединения 63 или носителя. На ФИГ. 13А и 13В показана активность в ответ на воздействие CD19+ клеток Т-клеточных композиций, которые не были инкубированы

(первичная) или были инкубированы в течение 14 дней (вторичная). Показаны результаты полифункционального ICS окрашивания (ФИГ. 13А) и цитолитическая активность (ФИГ. 13В) после воздействия экспрессирующих CD19 клеток. На ФИГ. 13С показаны уровни секретируемых цитокинов в супернатанте клеточных композиций, содержащих анти-CD19 CAR-экспрессирующие клетки, которые инкубировали в соотношении 1:1 с CD19-экспрессирующими клетками в течение 20 часов. Были измерены количества IL2, TNF и IFN-гамма, и показано среднее значение нормированных баллов для всех трех цитокинов.

[0065] На ФИГ. 14 показана экспрессия проапоптотической внутриклеточной каспазы 3 на размороженных CAR-T-клетках, полученных в присутствии ДМСО или соединения 63. Графики FACS показывают жизнеспособные CD3+CAR+ Т-клетки, полученные от трех разных доноров.

[0066] На ФИГ. 15 представлен график, показывающий количество жизнеспособных клеток с течением времени для CAR-T-клеток, полученных в присутствии ДМСО, PI-103 или соединения 63. Символы представляют среднее значение и SEM для лунок с культивируемыми клетками от трех разных доноров.

[0067] На ФИГ. 16 представлен график, показывающий уничтожение клеток-мишеней размороженными CAR-T-клетками, полученными в присутствии ДМСО, PI-103 или соединения 63. Анализы на уничтожение проводили непосредственно после размораживания (день 0) или в конце культивирования для стимуляции CAR (день 14), как описано на ФИГ. 15. Символы представляют среднее значение и SEM для лунок с культивируемыми клетками от трех разных доноров.

[0068] На ФИГ. 17А-17В представлены графики, показывающие, что CAR-T-клетки, полученные в присутствии PI-103 или соединения 63, имеют улучшенные и постоянные профили эффекторных цитокинов. CAR-T-клетки смешивали 1:1 (CAR-T:мишень) с несущими антиген клетками-мишенями сразу после размораживания («первичная», верхние панели) или в конце культивирования для стимуляции CAR, как описано на ФИГ. 15 («вторичная», нижние панели). Полифункциональность Т-клеток оценивали на основе внутриклеточной экспрессии цитокинов IL2, TNF и IFN $\gamma$  методом FACS в CAR-T-клетках, инкубированных с мишенями в присутствии ингибитора аппарата Гольджи в течение 5 часов (ФИГ. 17А). Также измеряли секрецию цитокинов в культуральные супернатанты из CAR-T-клеток, инкубированных с мишенями в течение 20 часов (ФИГ. 17В). Полученные в анализе значения нормировали и ранжировали по шкале характеристик для каждой группы доноров.

[0069] На ФИГ. 18 представлены результаты анализа дифференциальной экспрессии (DESeq2) методом РНК-сек, проведенного на обогащенных CD8+ и CD4+ CAR-T-клетках, полученных в присутствии PI-103 или соединения 63, как описано на ФИГ. 15. Дифференциальную экспрессию генов со скорректированным р-значением (р-скор) <0,1 для PI-103 в сравнении с ДМСО, или соединения 63 в сравнении с ДМСО, выбирали и рассчитывали значения log2 кратности изменения экспрессии генов, которые представлены. Гены, в значительной степени дифференциально экспрессированные

только в обработанных PI-103 клетках, представлены квадратами. Гены, в значительной степени дифференциально экспрессированные только в обработанных соединением 63 клетках, представлены кружками. Гены, экспрессированные в обеих T-клеточных композициях, представлены ромбами. Показатели дифференциальной экспрессии представляют собой среднее значение для трех отдельных доноров на группу.

[0070] На ФИГ. 19А-19В представлены графики, показывающие опухолевую нагрузку и выживаемость мышей с опухолями после лечения анти-CD19 CAR-T-клетками. На ФИГ. 19А представлены графики, показывающие опухолевую нагрузку у мышей после лечения либо высокой дозой ( $1 \times 10^6$  CAR-T-клеток/мышь), либо низкой дозой ( $2,5 \times 10^5$  CAR-T-клеток/мышь) анти-CD19 CAR-T-клеток. На ФИГ. 19В представлены графики, показывающие выживаемость мышей с опухолями после лечения либо высокой дозой, либо низкой дозой, анти-CD19 CAR-T-клеток.

[0071] На ФИГ. 20А-20В представлены графики, показывающие опухолевую нагрузку и выживаемость мышей с опухолями после лечения анти-CD19 CAR-T-клетками. На ФИГ. 20А представлены графики, показывающие опухолевую нагрузку у мышей после лечения либо высокой дозой ( $1 \times 10^6$  CAR-T-клеток/мышь), либо низкой дозой ( $2,5 \times 10^5$  CAR-T-клеток/мышь) анти-CD19 CAR-T-клеток. На ФИГ. 20В представлены графики, показывающие выживаемость мышей с опухолями после лечения либо высокой дозой, либо низкой дозой, анти-CD19 CAR-T-клеток.

[0072] На ФИГ. 21А-21В представлены графики, показывающие персистенцию анти-CD19 CAR-T-клеток с течением времени в крови у мышей-реципиентов. На ФИГ. 21А показано количество CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> T-клеток в день 18, день 25 и день 36 после инъекции у мышей, получавших высокую дозу ( $1 \times 10^6$  CAR-T-клеток/мышь) CAR-T-клеток, полученных в присутствии ДМСО (D), соединения 63 (C) или PI-103 (P). На ФИГ. 21В показаны количества CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> T-клеток в день 18, день 25 и день 36 после инъекции у мышей, получавших низкую дозу ( $2,5 \times 10^5$  CAR-T-клеток/мышь) CAR-T-клеток, полученных в присутствии ДМСО (D), соединения 63 (C) или PI-103 (P).

#### ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0073] В настоящем документе предложены способы получения композиции генетически модифицированных клеток, таких как генетически модифицированные CD4<sup>+</sup> и/или CD8<sup>+</sup> клетки, экспрессирующие рекомбинантный рецептор, в которых один или более этапов, таких как инкубирование, стимулирование и/или культивирование клеток, проводят в присутствии средства, ингибирующего активность mTOR. В конкретных вариантах осуществления композиция генетически модифицированных клеток представляет собой клеточную композицию обогащенных CD4<sup>+</sup> или обогащенных CD8<sup>+</sup> первичных T-клеток, которые включают T-клетки, генетически модифицированные рекомбинантным рецептором. В конкретных вариантах осуществления T-клетки представляют собой человеческие T-клетки. В некоторых аспектах культивирование клеток, например, размножение и/или пролиферацию клеток, проводят в присутствии средства, ингибирующего активность mTOR. В некоторых вариантах осуществления



клетки в композиции не контактировали с, не были инкубированы с, и/или не подвергались воздействию средства до культивирования. В конкретных вариантах осуществления культивирование приводит к пролиферации или размножению клеток в композиции, с получением произведенной композиции, содержащей генетически модифицированные CD4<sup>+</sup> и/или CD8<sup>+</sup> Т-клетки.

[0074] Производство генетически модифицированных Т-клеток, таких как CAR-Т-клетки, для использования в клеточной терапии включает выделение клеток, активацию клеток, трансдукцию или генетическую модификацию клеток рекомбинантным рецептором и размножение Т-клеток для введения клеток в клинических условиях. Этот процесс может приводить к получению части лекарственного препарата генетически модифицированных Т-клеток, которая в некоторых случаях может включать клетки, доведенные до состояния окончательного истощения, и/или в которой клетки лишены персистенции и/или не проявляют оптимальную эффективность. В некоторых случаях мультипотентность и репликативный потенциал Т-клеток снижены. В некоторых аспектах лекарственный препарат генетически модифицированных Т-клеток, содержащий истощенные клетки, может в некоторых случаях иметь ограниченную потенциальную эффективность лекарственного Т-клеточного препарата. Необходимы альтернативные способы производства терапевтических препаратов генетически модифицированных клеток, в которых сведены к минимуму или уменьшены процентные доли или количества клеток, которые являются, или вероятно станут, истощенными, лишенными персистенции и/или менее эффективными при введении субъекту.

[0075] Предложенные в настоящем документе способы основаны на тех наблюдениях, что персистенция, отсутствие истощения и/или эффективность генетически модифицированных клеток, например, CAR-Т-клеток, улучшаются при производстве или получении клеток в присутствии средства, ингибирующего активность mTOR. В некоторых аспектах средство представляет собой ингибитор мишени рапамицина в клетках млекопитающих (mTOR), например, mTOR млекопитающих, например, человека. В некоторых вариантах осуществления средство является специфическим для mTOR и не ингибирует или не имеет направленной активности против других родственных киназ, таких как киназа семейства фосфоинозитид-3-киназ (PI3-киназ). mTOR представляет собой эволюционно консервативную киназу со значительной гомологией последовательности с представителями семейства фосфоинозитид-3-киназ (PI3-киназ). В отличие от PI3K, mTOR является не липидной киназой, а скорее серин-треониновой протеинкиназой. В клетках млекопитающих mTOR закодирована одним геном, белковый продукт которого передает сигналы через два отдельных комплекса (mTORC1 и mTORC2). Как правило, считается, что mTOR регулирует различные клеточные процессы, включая рост и пролиферацию клеток. В Т-клетках mTOR может быть активирована различными стимулами, которые включают активацию рецепторов цитокинов и Т-клеточных рецепторов.

[0076] В некоторых аспектах предложенные способы используют в связи со

способом, в котором генетически модифицированные Т-клетки инкубируют, культивируют и/или поддерживают в культуре в присутствии средства, ингибирующего активность mTOR, которое способно, в некоторых аспектах, улучшать или стимулировать размножение, персистенцию и/или эффективность, например, противоопухолевую активность, клеток. В некоторых аспектах используют средство, ингибирующее активность киназы mTORC1 и mTORC2. В конкретных вариантах осуществления средство представляет собой избирательный ингибитор mTOR, например, оно не ингибирует дополнительную киназу, например, PI3K. В некоторых аспектах средство представляет собой соединение 63, соединение 155 или соединения 246.

[0077] В некоторых аспектах предложенные способы приводят к получению композиций клеток, содержащих первичные Т-клетки, генетически модифицированные для экспрессии рекомбинантного рецептора («генетически модифицированные клетки»), например, для использования в клеточной терапии, которые содержат меньше истощенных клеток и/или меньше клеток, имеющих маркеры или фенотипы, связанные с истощением, в сравнении с композициями генетически модифицированных клеток, полученных альтернативными способами, такими как альтернативные способы, которые не включают присутствие средства, ингибирующего активность mTOR. В конкретных вариантах осуществления генетически модифицированные клетки, полученные предложенными способами, имеют повышенную процентную долю подобных клеткам памяти Т-клеток, например долгоживущих Т-клеток памяти, в сравнении с клетками из композиций генетически модифицированных клеток, полученных альтернативными способами, такими как способы, которые не включают присутствие средства, ингибирующего активность mTOR, например, активность киназы, такую как активность киназы mTORC1 или mTORC2. В некоторых аспектах генетически модифицированные клетки, полученные предложенными способами, являются менее дифференцированными, чем генетически модифицированные клетки, полученные альтернативными способами. В некоторых аспектах предложенные способы приводят к получению генетически модифицированных клеток, отличающихся улучшенным или усиленным размножением, персистенцией и/или противоопухолевой активностью в сравнении с генетически модифицированными клетками, полученными альтернативными способами, такими как альтернативные способы, которые не включают присутствие средства, ингибирующего активность mTOR. Таким образом, в некоторых аспектах предложенные способы могут приводить к получению композиций генетически модифицированных клеток с повышенной терапевтической эффективностью в сравнении с генетически модифицированными клеточными композициями, полученными альтернативными способами, такими как альтернативные способы, которые не включают присутствие средства, ингибирующего активность mTOR. В конкретных вариантах осуществления предложенные способы могут приводить к получению композиций генетически модифицированных клеток с повышенной клинической долговечностью ответа в сравнении с генетически модифицированными клеточными композициями, полученными

альтернативными способами. В некоторых из таких вариантов осуществления сравнимый альтернативный способ представляет собой тот же способ, который отличается лишь тем, что альтернативный способ не включает присутствие средства, ингибирующего активность mTOR.

[0078] Все публикации, включая патентные документы, научные статьи и базы данных, упомянутые в настоящей спецификации, включены в настоящий документ посредством ссылки в полном объеме и для всех целей в такой же степени, как если бы каждая отдельная публикация была индивидуально включена посредством ссылки. Если определение, приведенное в настоящем документе отличается или иным образом не соответствует определению, приведенному в патентах, патентных заявках, опубликованных патентных заявках и других публикациях, включенных в настоящий документ посредством ссылки, определение, приведенное в настоящем документе, имеет преимущественную силу относительно определения в публикации, содержание которой включено в настоящий документ посредством ссылки.

[0079] Заголовки разделов, используемые в настоящем документе, предназначены исключительно для организационных целей и не должны восприниматься как ограничивающие описанный объект изобретения.

### **I. Способ выделения, культивирования и генетической модификации клеток для адоптивной клеточной терапии**

[0080] В настоящем документе предложены способы получения произведенной композиции генетически модифицированных клеток, таких как генетически модифицированные первичные CD4<sup>+</sup> Т-клетки и/или генетически 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, используют в связи со способом, который включает инкубацию, культивирование и/или поддержание в культуре клеток в присутствии средства, ингибирующего активность mTOR, такого как любое средство, описанное в настоящем документе, например, соединение 63, для получения произведенной композиции генетически модифицированных клеток. В некоторых вариантах осуществления способы используют в связи со способом, который включает культивирование композиции генетически модифицированных клеток, например, в условиях, стимулирующих размножение и/или пролиферацию, в присутствии средства, ингибирующего активность mTOR, такого как любое средство, описанное в настоящем документе, например, соединение 63, для получения произведенной композиции генетически модифицированных клеток. В некоторых вариантах осуществления средство, ингибирующее активность mTOR, ингибирует активность одной или более дополнительных киназ. В некоторых вариантах осуществления средство избирательно и/или специфически ингибирует активность mTOR. В конкретных вариантах осуществления средство, ингибирующее активность mTOR, представляет собой средство,

описанное в настоящем документе, например, в разделе II. В некоторых вариантах осуществления средство ингибирует активность киназы mTOR. В конкретных вариантах осуществления средство ингибирует mTORC1 и/или mTORC2. В конкретных вариантах осуществления средство представляет собой соединение 63, соединение 155 или соединения 246. В конкретных вариантах осуществления средство представляет собой соединение 63.

[0081] В некоторых вариантах осуществления способы создания или получения генетически модифицированных клеток, например, генетически модифицированных CD4+ Т-клеток и/или генетически модифицированных CD8+ Т-клеток, включают одно или более из получения клеток от субъекта, подготовки, обработки, инкубации в стимулирующих условиях и/или генетической модификации (например, трансдукции) клеток. В некоторых вариантах осуществления способ включает этапы обработки, выполняемые в следующем порядке: исходные клетки, например, первичные клетки, сначала выделяют, например, выбирают или отделяют, из биологического образца; исходные клетки инкубируют в стимулирующих условиях, генетически модифицируют при помощи векторных частиц, например, вирусных векторных частиц, для введения рекомбинантного полинуклеотида в клетки, например, методом трансдукции или трансфекции; культивируют генетически модифицированные клетки, например, трансдуцированные клетки, например, для размножения клеток; и собирают, получают и/или вносят в контейнер все или часть клеток для формулирования клеток в произведенную композицию. В некоторых вариантах осуществления клетки полученной произведенной композиции повторно вводят тому же субъекту, до или после криоконсервации. В некоторых вариантах осуществления произведенные композиции генетически модифицированных клеток подходят для использования в терапии, например, аутологичной клеточной терапии.

[0082] В некоторых вариантах осуществления один или более этапов, или стадий, проводят в присутствии средства, ингибирующего активность mTOR, такого как любое из средств, описанных в настоящем документе, например, соединение 63. В некоторых вариантах осуществления один или более этапов выделения, обогащения, инкубации, генетической модификации, трансдукции, трансфекции, культивирования, поддержания в культуре, сбора, формулирования, хранения и/или криоконсервации клеток клеточных композиций проводят в присутствии средства, ингибирующего активность mTOR. В конкретных вариантах осуществления клетки культивируют в присутствии средства, ингибирующего активность mTOR.

[0083] В некоторых вариантах осуществления генетически модифицированные клетки культивируют в присутствии средства, ингибирующего активность mTOR, такого как любое из средств, описанных в настоящем документе, например, соединение 63, и в конкретных вариантах осуществления клетки не контактировали с, не были инкубированы с, и/или не подвергались воздействию средства, ингибирующего активность mTOR, до культивирования. В некоторых вариантах осуществления исходные клетки,

стимулированные клетки и/или генетически модифицированные клетки до культивирования клеток с целью индукции или стимуляции их размножения или пролиферации не контактировали с, не были подвергнуты воздействию и/или не были инкубированы со средством, ингибирующим активность mTOR. В конкретных вариантах осуществления этапы выделения, обогащения, инкубации в одном или более из условий для активации, генетической модификации, трансдукции, трансфекции, формулирования, хранения и/или криоконсервации не проводят в присутствии ингибитора mTOR.

[0084] В конкретных вариантах осуществления предложенные способы используют для получения произведенных композиций клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор, из исходных, и/или исходной композиции клеток. В некоторых вариантах осуществления композиция клеток представляет собой композицию обогащенных Т-клеток, обогащенных CD4<sup>+</sup> Т-клеток и/или обогащенных CD8<sup>+</sup> Т-клеток (в настоящем документе также называемую композицией обогащенных Т-клеток, композицией обогащенных CD4<sup>+</sup> Т-клеток и композицией обогащенных CD8<sup>+</sup> Т-клеток, соответственно). В конкретных вариантах осуществления композицию обогащенных Т-клеток, обогащенных CD4<sup>+</sup> Т-клеток или обогащенных CD8<sup>+</sup> Т-клеток культивируют в присутствии средства, ингибирующего активность mTOR. В некоторых вариантах осуществления композицию обогащенных CD4<sup>+</sup> Т-клеток культивируют в присутствии средства, ингибирующего активность mTOR, такого как любое из средств, описанных в настоящем документе, например, соединение 63. В конкретных вариантах осуществления композицию обогащенных CD8<sup>+</sup> Т-клеток культивируют в присутствии средства, ингибирующего активность mTOR.

[0085] В некоторых вариантах осуществления предложенные способы используют для инкубации исходной композиции, которая содержит первичные Т-клетки, в стимулирующих условиях. В некоторых вариантах осуществления стимулирующие условия представляют собой или включают инкубацию исходной композиции в присутствии стимулирующего реагента. В конкретных вариантах осуществления стимулирующий реагент представляет собой или включает гранулы, например, парамагнитные гранулы, с конъюгированными на поверхности анти-CD3 и анти-CD28 антителами. В конкретных вариантах осуществления клетки исходной композиции не подвергают воздействию средства, ингибирующего активность mTOR, до или в процессе инкубации. В некоторых аспектах инкубацию проводят с исходной композицией обогащенных Т-клеток, например, CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> клеток. В некоторых вариантах осуществления исходная композиция представляет собой или включает обогащенные CD4<sup>+</sup> Т-клетки. В конкретных вариантах осуществления исходная композиция представляет собой или включает обогащенные CD8<sup>+</sup> клетки. В некоторых вариантах осуществления отдельные композиции обогащенных CD4<sup>+</sup> Т-клеток и CD8<sup>+</sup> Т-клеток, например, из одного и того же биологического образца, инкубируют отдельно. В некоторых вариантах осуществления стимулирующие условия инкубации могут быть одинаковыми для обеих композиций. В конкретных вариантах осуществления

стимулирующие условия могут быть разными. В конкретных вариантах осуществления инкубация одной или более исходных композиций в стимулирующих условиях приводит к получению одной или более стимулированных композиций.

[0086] В конкретных вариантах осуществления рекомбинантный рецептор вводят в клетки стимулированной композиции. В конкретных вариантах осуществления рекомбинантный рецептор вводят в клетку путем трансдукции стимулированной композиции вирусным вектором. В конкретных вариантах осуществления вирусный вектор представляет собой или включает полинуклеотид, кодирующий рекомбинантный рецептор. В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор представляет собой ретровирусный вектор. В конкретных вариантах осуществления вирусный вектор представляет собой лентивирусный вектор или гамма-ретровирусный вектор. В некоторых вариантах осуществления стимулированная композиция включает или содержит обогащенные Т-клетки, например, CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> клетки. В некоторых вариантах осуществления стимулированная композиция представляет собой или включает обогащенные CD4<sup>+</sup> Т-клетки. В конкретных вариантах осуществления стимулированная композиция представляет собой или включает обогащенные CD8<sup>+</sup> клетки. В некоторых вариантах осуществления отдельные композиции обогащенных CD4<sup>+</sup> Т-клеток и CD8<sup>+</sup> Т-клеток, например, из одного и того же биологического образца, генетически модифицируют отдельно. В конкретных вариантах осуществления рекомбинантный рецептор представляет собой химерный антигенный рецептор (CAR). В конкретных вариантах осуществления CAR представляет собой анти-CD19 CAR.

[0087] В некоторых вариантах осуществления композицию генетически модифицированных клеток, например, клеток, трансдуцированных или трансфицированных для экспрессии рекомбинантного рецептора, культивируют в присутствии средства, ингибирующего активность mTOR, такого как любое из средств, описанных в настоящем документе, например, соединение 63. В конкретных вариантах осуществления культивирование приводит к пролиферации и/или размножению клеток в композиции, например, к получению произведенной композиции, содержащей генетически модифицированные Т-клетки. В некоторых аспектах клетки композиции не были подвергнуты воздействию, не контактировали с, и/или не были инкубированы со средством, ингибирующим активность mTOR, таким как любое из средств, описанных в настоящем документе, например, соединение 63, до культивирования. В конкретных вариантах осуществления клетки ранее не были инкубированы, культивированы, стимулированы, генетически модифицированы, трансдуцированы и/или трансфицированы в присутствии ингибитора mTOR, такого как любое из средств, описанных в настоящем документе, например, соединение 63.

[0088] В конкретных вариантах осуществления генетически модифицированная композиция клеток представляет собой генетически модифицированную композицию обогащенных CD4<sup>+</sup> Т-клеток. В конкретных вариантах осуществления генетически модифицированная композиция представляет собой композицию генетически

модифицированных CD8<sup>+</sup> Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления предложенные способы используют в сочетании с отдельным культивированием отдельно генетически модифицированных композиций обогащенных CD4<sup>+</sup> Т-клеток и обогащенных CD8<sup>+</sup> Т-клеток в присутствии средства, ингибирующего активность mTOR, такого как любое из средств, описанных в настоящем документе, например, соединение 63.

[0089] В некоторых вариантах осуществления средство ингибирует, уменьшает и/или снижает одну или более активностей, связанных с mTOR. В некоторых вариантах осуществления активность представляет собой активность киназы. В некоторых вариантах осуществления активность представляет собой активность mTORC1 и/или mTORC2. В некоторых вариантах осуществления средство выбирают из группы, состоящей из BEZ235, BGT226, GDC0980, NVP-BEZ235, PF-04691502, PI103, SAR245409, SF1126, VS5584 или XL765, пиразолопиримидина, торина 1, торкиниба, PP30, Ku-0063794, WAY-600 (Wyeth), WAY-687 (Wyeth), WAY-354 (Wyeth), OSI-027, DS3078a, AZD8055, рапамицина, темсиролимуса, эверолимуса, дефоролимуса или AZD8055. В конкретных вариантах осуществления средство представляет собой соединение 63, соединение 155 или соединение 246. В некоторых вариантах осуществления средство представляет собой соединение 63.

[0090] В конкретных вариантах осуществления композиция клеток представляет собой композицию обогащенных Т-клеток, обогащенных CD4<sup>+</sup> Т-клеток и/или обогащенных CD8<sup>+</sup> Т-клеток (далее в настоящем документе также называемую композицией обогащенных Т-клеток, композицией обогащенных CD4<sup>+</sup> Т-клеток и композицией обогащенных CD8<sup>+</sup> Т-клеток, соответственно). В конкретных вариантах осуществления композицию обогащенных Т-клеток, обогащенных CD4<sup>+</sup> Т-клеток или обогащенных CD8<sup>+</sup> Т-клеток инкубируют в стимулирующих условиях в присутствии средства, ингибирующего активность mTOR, такого как любое из средств, описанных в настоящем документе, например, соединение 63. В некоторых вариантах осуществления композицию обогащенных Т-клеток, обогащенных CD4<sup>+</sup> Т-клеток или обогащенных CD8<sup>+</sup> Т-клеток генетически модифицируют, например, трансдуцируют или трансфицируют, для экспрессии рекомбинантного рецептора в присутствии средства, ингибирующего активность mTOR, такого как любое из средств, описанных в настоящем документе, например, соединение 63.

[0091] В некоторых вариантах осуществления предложенные способы используют для выделения, разделения, селекции, активации или стимуляции, трансдукции, промывания, суспендирования, разбавления, концентрирования и/или формулирования одной композиции обогащенных Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления композиция обогащенных Т-клеток представляет собой композицию клеток, содержащую обогащенные CD4<sup>+</sup> Т-клетки. В конкретных вариантах осуществления композиция обогащенных CD4<sup>+</sup> Т-клеток содержит по меньшей мере 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% или 99,9% CD4<sup>+</sup> Т-клеток. В конкретных вариантах осуществления

композиция обогащенных CD4+ Т-клеток содержит 100% CD4+ Т-клеток или содержит примерно 100% CD4+ Т-клеток. В конкретных вариантах осуществления композиция обогащенных Т-клеток включает или содержит менее 20%, менее 10%, менее 5%, менее 1%, менее 0,1% или менее 0,01% CD8+ Т-клеток, и/или не содержит CD8+ Т-клетки, и/или свободна или практически свободна от CD8+ Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления популяции клеток состоят практически из CD4+ Т-клеток.

[0092] В некоторых вариантах осуществления композиция обогащенных Т-клеток представляет собой композицию обогащенных CD8+ Т-клеток. В конкретных вариантах осуществления композиция обогащенных CD8+ Т-клеток содержит по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% или 99,9% CD8+ Т-клеток, или содержит примерно 100% CD8+ Т-клеток. В конкретных вариантах осуществления композиция обогащенных CD8+ Т-клеток включает или содержит менее 20%, менее 10%, менее 5%, менее 1%, менее 0,1% или менее 0,01% CD4+ Т-клеток, и/или не содержит CD4+ Т-клетки, и/или свободна или практически свободна от CD4+ Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления популяции клеток состоят практически из CD8+ Т-клеток.

[0093] В некоторых вариантах осуществления предложенные способы используют для получения двух или более отдельных произведенных композиций обогащенных Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления предложенные способы отдельно используют для двух или более отдельных композиций обогащенных Т-клеток. В конкретных вариантах осуществления способы могут быть использованы для отдельной активации и/или стимуляции двух или более композиций обогащенных Т-клеток; отдельной генетической модификации двух или более композиций обогащенных Т-клеток; и/или отдельного культивирования двух или более композиций обогащенных Т-клеток. В конкретных вариантах осуществления способы также могут быть использованы для выделения или селекции разных клеток из биологического образца для получения отдельной исходной композиции обогащенных Т-клеток, например, отдельных композиций обогащенных CD4+ Т-клеток и обогащенных CD8+ Т-клеток. В конкретных вариантах осуществления предложенные способы могут быть использованы для отдельного сбора, получения и/или формулирования отдельных композиций обогащенных Т-клеток после того, как Т-клетки были инкубированы, активированы, стимулированы, генетически модифицированы, трансдуцированы, трансфицированы и/или культивированы. В некоторых вариантах осуществления две или более отдельных композиций обогащенных Т-клеток включают композицию обогащенных CD4+ Т-клеток. В конкретных вариантах осуществления две или более отдельных композиций включают CD8+ Т-клетки. В некоторых вариантах осуществления две или более отдельных композиций включают композицию обогащенных CD4+ Т-клеток и композицию обогащенных CD8+ Т-клеток.

[0094] В конкретных вариантах осуществления композиции обогащенных Т-клеток можно собирать, формулировать для криоконсервации, замораживать и/или хранить при температуре ниже 0°C, ниже -20°C, или при температуре, или ниже, -70°C или -80°C до,



во время или после любой стадии или этапа способа получения произведенных композиций обогащенных Т-клеток, экспрессирующих рекомбинантные рецепторы. В некоторых вариантах осуществления клетки можно хранить в течение периода времени менее 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 дней, или в течение периода времени менее 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 недель, или в течение периода времени по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8 недель, или в течение периода времени более 8 недель. После хранения композиции обогащенных Т-клеток можно размораживать, и обработку можно продолжать с того же этапа способа. В некоторых вариантах осуществления исходные композиции обогащенных Т-клеток замораживают и хранят до последующей обработки, например, инкубации в стимулирующих условиях. В конкретных вариантах осуществления культивированные и/или сформулированные композиции обогащенных Т-клеток замораживают и хранят до введения субъекту, например, в качестве аутологичной клеточной терапии.

[0095] В конкретных вариантах осуществления отдельные клеточные композиции обогащенных Т-клеток объединяют в одну композицию. Например, в некоторых вариантах осуществления композицию обогащенных CD4<sup>+</sup> Т-клеток объединяют с композицией обогащенных CD8<sup>+</sup> Т-клеток в одну композицию обогащенных CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-клеток. В конкретных вариантах осуществления отдельные композиции происходят, например, изначально были выделены, отобраны и/или обогащены, из одного и того же биологического образца, например, одного и того же биологического образца, полученного, собранного и/или взятого от одного субъекта. В некоторых вариантах осуществления отдельные композиции отдельно обрабатывают в течение одного или более этапов или стадий способа получения произведенных композиций, например, способа, связанного с предложенными способами. В некоторых вариантах осуществления отдельные композиции можно объединять в одну композицию до, в процессе или после любого этапа или стадии способа получения произведенных композиций. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления отдельные исходные, стимулированные, генетически модифицированные, культивированные, сформулированные и/или собранные композиции обогащенных Т-клеток из одного и того же биологического образца объединяют в одну композицию и, в конкретных вариантах осуществления, далее обрабатывают в виде одной композиции. В конкретных вариантах осуществления отдельные произведенные композиции обогащенных клеток объединяют в одну произведенную композицию перед введением клеток субъекту.

[0096] В конкретных вариантах осуществления на любой стадии или этапе способа часть клеток можно отбирать или собирать, например, клетки можно отбирать из композиции обогащенных Т-клеток, когда композиция находится в закрытой системе, например, в процессе выделения, инкубации, генетической модификации, культивирования и/или формулирования. В конкретных вариантах осуществления такие клетки можно анализировать на наличие маркеров, признаков или характеристик, включая, но без ограничения, жизнеспособность, апоптоз, активацию, стимуляцию, рост

и/или истощение. В некоторых вариантах осуществления клетки отбирают или собирают автоматизированным способом, 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.

[0097] Также предложены клетки и композиции, полученные данными способами, включая фармацевтические композиции и препараты, а также наборы, системы и устройства для применения способов. Также предложены способы применения клеток и композиций, полученных способами, включая терапевтические способы, такие как способы адоптивной клеточной терапии, и фармацевтические композиции для введения субъектам.

#### **А. Образцы и клеточные препараты**

[0098] В конкретных вариантах осуществления предложенные способы используют для выделения, селекции и/или обогащения клеток из биологического образца для получения 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, например, полученных, или извлеченных, из субъекта, например, субъекта, имеющего конкретное заболевание или состояние, или который нуждается в клеточной терапии, или который будет получать клеточную терапию. В некоторых аспектах субъект является человеком, например, субъект, который является пациентом, нуждающимся в конкретном терапевтическом вмешательстве, таком как адоптивная клеточная терапия, для которой клетки выделяют, обрабатывают и/или генетически модифицируют. Соответственно, в некоторых вариантах осуществления клетки представляют собой первичные клетки, например, первичные человеческие клетки. Образцы включают ткани, жидкости и другие образцы, полученные непосредственно от субъекта. Биологический образец может представлять собой образец, полученный непосредственно из биологического источника, или образец, который был обработан. Биологические образцы включают, но без ограничения, жидкости организма, такие как кровь, плазма, сыворотка, цереброспинальная жидкость, синовиальная жидкость, моча и пот, образцы тканей и органов, включая обработанные образцы, полученные из них.

[0099] В некоторых аспектах образец представляет собой кровь или полученный из крови образец, или представляет собой продукт, или получен путем, афереза или лейкофереза. Иллюстративные образцы включают цельную кровь, мононуклеарные клетки периферической крови (МКПК), лейкоциты, костный мозг, тимус, биопсийный образец ткани, опухоль, клетки лейкоза, лимфомы, лимфатический узел, кишечную лимфоидную ткань, мукозную лимфоидную ткань, селезенку, другие лимфоидные ткани, печень, легкое, желудок, кишечник, толстую кишку, почку, поджелудочную железу, молочную железу, кость, предстательную железу, шейку матки, яички, яичники, миндалины или другие органы и/или клетки, полученные из них. Образцы включают, в

контексте клеточной терапии, например, адоптивной клеточной терапии, образцы из аутологических и аллогенных источников.

[0100] В некоторых примерах клетки из циркулирующей крови субъекта получают, например, путем афереза или лейкоафереза. В некоторых аспектах образцы содержат лимфоциты, включая Т-клетки, моноциты, гранулоциты, В-клетки, другие ядродержащие белые клетки крови, эритроциты и/или тромбоциты, и в некоторых аспектах содержат клетки, отличные от эритроцитов и тромбоцитов.

[0101] В некоторых вариантах осуществления клетки крови, полученные от субъекта, промывают, например, для удаления фракции плазмы и для переноса клеток в соответствующий буфер или среду для последующих этапов обработки. В некоторых вариантах осуществления клетки промывают фосфатно-солевым буфером (PBS). В некоторых вариантах осуществления промывочный раствор не содержит кальций и/или магний, и/или многие, или все, из двухвалентных катионов. В некоторых аспектах этап промывания проводят с использованием полуавтоматической «проточной» центрифуги (например, клеточного процессора Cobe 2991, Baxter) в соответствии с инструкциями производителя. В некоторых аспектах этап промывания проводят методом проточной фильтрации вдоль потока (TFF) в соответствии с инструкциями производителя. В некоторых вариантах осуществления клетки ресуспендируют в различных биосовместимых буферах после промывания, таких как, например, не содержащий  $\text{Ca}^{++}/\text{Mg}^{++}$  PBS. В конкретных вариантах осуществления компоненты образца клеток крови удаляют, и клетки непосредственно ресуспендируют в среде для культивирования.

[0102] В некоторых вариантах осуществления способы получения включают этапы замораживания, например, криоконсервации, клеток, либо до, либо после выделения, селекции и/или обогащения, и/или инкубации для трансдукции и генетической модификации, и/или после культивирования, и/или сбора генетически модифицированных клеток. В некоторых вариантах осуществления замораживание, с последующим этапом размораживания, позволяет удалять гранулоциты и, в некоторой степени, моноциты в клеточной популяции. В некоторых вариантах осуществления клетки суспендируют в растворе для замораживания, например, после этапа промывания для удаления плазмы и тромбоцитов. В некоторых аспектах можно использовать любой из различных известных растворов для замораживания и параметров. В некоторых вариантах осуществления клетки замораживают, например, криоконсервируют или криосохраняют, в среде и/или растворе с конечной концентрацией ДМСО, составляющей или составляющей примерно 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%. В конкретных вариантах осуществления клетки замораживают, например, криоконсервируют или криосохраняют, в среде и/или растворе с конечной концентрацией ЧСА, составляющей или составляющей примерно 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%. В одном примере используют PBS, содержащий 20%

ДМСО и 8% человеческого сывороточного альбумина (ЧСА), или другую подходящую среду для замораживания клеток. Затем его разбавляют 1:1 средой так, что конечные концентрации ДМСО и ЧСА составляют 10% и 4%, соответственно. Как правило, затем клетки замораживают до температуры или до температуры примерно  $-80^{\circ}\text{C}$  со скоростью, составляющей или составляющей примерно  $1^{\circ}$  в минуту, и хранят в резервуаре-хранилище в паровой фазе жидкого азота.

[0103] В некоторых вариантах осуществления выделение клеток, или популяций клеток, включает один или более этапов подготовки и/или не аффинного разделения клеток. В некоторых примерах клетки промывают, центрифугируют и/или инкубируют в присутствии одного или более реагентов, например, для удаления нежелательных компонентов, обогащения по желательным компонентам, лизиса или удаления клеток, чувствительных к конкретным реагентам. В некоторых примерах клетки разделяют на основании одного или более свойств, таких как плотность, адгерентность, размер, чувствительность и/или устойчивость к конкретным компонентам. В некоторых вариантах осуществления способы включают методы разделения на основе плотности, например, получение белых клеток крови из периферической крови путем лизиса эритроцитов и центрифугирования через градиент плотности перколла или фиколла.

[0104] В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере часть этапа селекции включает инкубацию клеток с селективным реагентом. Инкубацию с селективным реагентом или реагентами, например, в виде части способов селекции, можно проводить с использованием одного или более селективных реагентов для селекции клеток одного или более разных типов на основе экспрессии, или присутствия, 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 можно применять любой известный способ с использованием селективного реагента или реагентов для разделения на основе наличия таких маркеров. В некоторых вариантах осуществления использование селективного реагента или реагентов приводит к разделению, которое представляет собой разделение на основе аффинности или иммунной аффинности. Например, в некоторых аспектах селекция включает инкубацию с реагентом или реагентами для разделения клеток и клеточных популяций на основе клеточной экспрессии или уровня экспрессии одного или более маркеров, как правило, клеточных поверхностных маркеров, например, путем инкубации с антителом или связывающим партнером, специфически связывающим такие маркеры, за которой, как правило, следуют этапы промывания и отделения клеток, связанных с антителом или связывающим партнером, от клеток, не связанных с антителом или связывающим партнером.

[0105] В некоторых аспектах таких способов некоторый объем клеток смешивают с некоторым количеством нужного реагента для основанной на аффинности селекции. Селекцию на основе иммунной аффинности можно проводить с использованием любой системы или способа, которые приводят к благоприятному энергетическому

взаимодействию между разделяемыми клетками и молекулой, специфически связывающей маркер на клетке, например, антителом или другим связывающим партнером, находящимся на твердой поверхности, например, частице. В некоторых вариантах осуществления способы применяют с использованием частиц, таких как гранулы, например, магнитные гранулы, которые покрыты селективным средством (например, антителом), специфическим для маркера клеток. Частицы (например, гранулы) можно инкубировать или смешивать с клетками в контейнере, таком как пробирка или мешок, производя встряхивание или перемешивание, при постоянном соотношении плотности клеток и частиц (например, гранул) для стимуляции энергетически благоприятных взаимодействий. В других случаях способы включают селекцию клеток, при этом селекцию, полностью или частично, проводят во внутренней полости центрифужной камеры, например, при вращении центрифуги. В некоторых вариантах осуществления инкубацию клеток с селективными реагентами, такими как реагенты для селекции на основе иммунной аффинности, проводят в центрифужной камере. В конкретных вариантах осуществления выделение или разделение проводят с использованием системы, устройства или аппарата, описанного в публикации международной патентной заявки с номером WO2009/072003, или в US 20110003380 A1. В одном примере система представляет собой систему, описанную в публикации международной патентной заявки с номером WO2016/073602.

[0106] В некоторых вариантах осуществления проведение таких этапов селекции, или их части (например, инкубации с покрытыми антителом частицами, например, магнитными гранулами), в полости центрифужной камеры позволяет пользователю контролировать некоторые параметры, такие как объем разных растворов, добавление раствора в процессе обработки и время этого добавления, которые могут обеспечивать преимущества в сравнении с другими известными способами. Например, возможность уменьшать объем жидкости в полости в процессе инкубации может приводить к повышению концентрации частиц (например, реагента в виде гранул), используемых в селекции, и, таким образом, химического потенциала раствора, без оказания влияния на общее количество клеток в полости. Это, в свою очередь, может приводить к усилению парных взаимодействий между обрабатываемыми клетками и частицами, используемыми для селекции. В некоторых вариантах осуществления проведение этапа инкубации в камере, например, в сочетании с системами, электронными схемами и контролем, как описано в настоящем документе, позволяет пользователю осуществлять перемешивание раствора в нужный момент(ы) времени в процессе инкубации, что также может приводить к усилению взаимодействия.

[0107] В некоторых вариантах осуществления в центрифужной камере проводят по меньшей мере часть этапа селекции, включающую инкубацию клеток с селективным реагентом. В некоторых аспектах таких способов некоторый объем клеток смешивают с некоторым количеством нужного реагента для селекции на основе аффинности, которое намного меньше, чем обычно используемое количество при проведении аналогичной

селекции в пробирке или контейнере для селекции такого же количества клеток и/или объема клеток согласно инструкциям производителя. В некоторых вариантах осуществления используют количество селективного реагента, или реагентов, которое составляет не более 5%, не более 10%, не более 15%, не более 20%, не более 25%, не более 50%, не более 60%, не более 70% или не более 80% от количества того же селективного реагента(ов,) используемого для селекции того же количества клеток и/или того же объема клеток при инкубации в пробирке или контейнере согласно инструкциям производителя.

[0108] В некоторых вариантах осуществления для селекции, например, основанной на иммунной аффинности селекции, клеток клетки инкубируют в полости камеры в композиции, которая также содержит селективный буфер с селективным реагентом, таким как молекула, которая специфически связывает поверхностный маркер на клетке, по которой желательно обогащение и/или истощение, но не на других клетках в композиции, например, антителом, которое, необязательно, связано с каркасом, таким как полимер или поверхность, например, гранула, например, магнитная гранула, такая как магнитная гранула, связанная с моноклональными антителами, специфическими в отношении CD4 и CD8. В некоторых описанных вариантах осуществления селективный реагент добавляют к клеткам в полости камеры в количестве, которое значительно меньше (например, составляет не более 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70% или 80% от количества), чем количество, которое обычно используют, или которое было бы необходимо, для достижения примерно такой же, или аналогичной, эффективности селекции такого же количества клеток или такого же объема клеток при проведении селекции в пробирке со встряхиванием или вращением. В некоторых вариантах осуществления инкубацию проводят с добавлением к клеткам селективного буфера и селективного реагента для достижения целевого объема при инкубации с реагентом, составляющего, например, от 10 мл до 200 мл, например, по меньшей мере или по меньшей мере примерно 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 селективный буфер и селективный реагент предварительно смешивают перед добавлением к клеткам. В некоторых вариантах осуществления селективный буфер и селективный реагент отдельно добавляют к клеткам. В некоторых вариантах осуществления инкубацию для селекции проводят в условиях периодического осторожного перемешивания, что может способствовать энергетически благоприятным взаимодействиям и за счет этого позволять использовать, в целом, меньше селективного реагента, достигая при этом высокой эффективности селекции.

[0109] В некоторых вариантах осуществления общая продолжительность инкубации с селективным реагентом составляет от или от примерно 5 минут до 6 часов, например, от 30 минут до 3 часов, например, по меньшей мере или по меньшей мере примерно 30 минут, 60 минут, 120 минут или 180 минут.

[0110] В некоторых вариантах осуществления инкубацию, как правило, проводят при перемешивании, например, при вращении, как правило, с относительно низким

ускорением или скоростью, например, со скоростью, меньшей чем скорость, используемая для осаждения клеток, например, от или от примерно 600 об/мин до 1700 об/мин (например, при или примерно при, или по меньшей мере при 600 об/мин, 1000 об/мин или 1500 об/мин, или 1700 об/мин), при ОЦУ для образца или стенки камеры, или другого контейнера, составляющем от или от примерно 80 g до 100 g (например, при или примерно при, или по меньшей мере при 80 g, 85 g, 90 g, 95 g или 100 g). В некоторых вариантах осуществления вращение проводят с повторяющимися интервалами вращения при такой низкой скорости, за которыми следует период покоя, например, вращение и/или покой в течение 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 секунд, например, вращение в течение примерно 1 или 2 секунд, с последующим покоем в течение примерно 5, 6, 7 или 8 секунд.

[0111] В некоторых вариантах осуществления такой способ применяют в полностью закрытой системе, в которую встроена камера. В некоторых вариантах осуществления такой способ (и в некоторых аспектах также один или более дополнительных этапов, таких как предыдущий этап промывания образца, содержащего клетки, такого как полученный при аферезе образец), применяют в автоматизированном режиме, так что клетки, реагент и другие компоненты вводят в камеру и выводят из камеры в соответствующие моменты времени и проводят центрифугирование для завершения промывания и этапа связывания в одной закрытой системе с использованием автоматизированной программы.

[0112] В некоторых вариантах осуществления после инкубации и/или смешивания клеток с селективным реагентом и/или реагентами проводят разделение инкубируемых клеток для отбора клеток на основе присутствия или отсутствия конкретного реагента или реагентов. В некоторых вариантах осуществления разделение проводят в той же закрытой системе, в которой проводят инкубацию клеток с селективным реагентом. В некоторых вариантах осуществления после инкубации с селективными реагентами инкубируемые клетки, включая клетки, с которыми связан селективный реагент, переносят в систему для разделения клеток на основе иммунной аффинности. В некоторых вариантах осуществления система для основанного на иммунной аффинности разделения представляет собой или включает магнитную разделительную колонку.

[0113] Такие этапы разделения могут быть основаны на положительной селекции, при которой клетки, связавшиеся с реагентами, например, антителом или связывающим партнером, сохраняют для дальнейшего использования, и/или отрицательной селекции, при которой сохраняют клетки, не связавшиеся с реагентом, например, антителом или связывающим партнером. В некоторых примерах обе фракции сохраняют для дальнейшего использования. В некоторых аспектах может быть особенно полезной отрицательная селекция, когда отсутствует антитело, специфически узнающее тип клеток в гетерогенной популяции, так что разделение лучше всего проводить на основе маркеров, экспрессируемых клетками, отличными от желательной популяции.

[0114] В некоторых вариантах осуществления этапы способа дополнительно включают отрицательную и/или положительную селекцию инкубируемых клеток,

например, с использованием системы или аппарата, способного проводить селекцию на основе аффинности. В некоторых вариантах осуществления выделение проводят путем обогащения по конкретной клеточной популяции методом положительной селекции, или истощения по конкретной клеточной популяции методом отрицательной селекции. В некоторых вариантах осуществления положительную или отрицательную селекцию проводят путем инкубации клеток с одним или более антителами или другими связывающими веществами, которые специфически связывают один или более поверхностных маркеров, экспрессируемых (маркер<sup>+</sup>) или экспрессируемых на относительно высоком уровне (маркер<sup>high</sup>) на клетках, отобранных путем положительной или отрицательной селекции, соответственно.

[0115] Разделение не обязательно должно приводить к 100% обогащению или удалению конкретных клеточных популяций или клеток, экспрессирующих конкретный маркер. Например, положительная селекция или обогащение для клеток конкретного типа, таких как те, которые экспрессируют маркер, означает увеличение числа или процентной доли таких клеток, но не обязательно приводит к полному отсутствию клеток, не экспрессирующих маркер. Аналогично, отрицательная селекция, удаление или истощение клеток конкретного типа, таких как те, которые экспрессируют маркер, означает уменьшение числа или процентной доли таких клеток, но не обязательно приводит к полному удалению всех таких клеток.

[0116] В некоторых примерах проводят несколько раундов этапов разделения, при этом положительно или отрицательно отобранную фракцию из одного этапа подвергают другому этапу разделения, например, последующей положительной или отрицательной селекции. В некоторых примерах один этап разделения может приводить к одновременному истощению клеток, экспрессирующих несколько маркеров, например, путем инкубации клеток с несколькими антителами или связывающими партнерами, каждый из которых специфичен для маркера, являющегося мишенью для отрицательной селекции. Аналогично, клетки нескольких типов могут быть одновременно положительно отобраны путем инкубации клеток с несколькими антителами или связывающими партнерами, специфичными для маркеров, экспрессируемых на клетках разных типов.

[0117] Например, в некоторых аспектах конкретные субпопуляции Т-клеток, таких как клетки, имеющие или экспрессирующие на высоких уровнях один или более поверхностных маркеров, например, CD28<sup>+</sup>, CD62L<sup>+</sup>, CCR7<sup>+</sup>, CD27<sup>+</sup>, CD127<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, CD45RA<sup>+</sup> и/или CD45RO<sup>+</sup> Т-клетки, выделяют методами положительной и отрицательной селекции. В некоторых вариантах осуществления такие клетки отбирают путем инкубации с одним или более антителами, или связывающими партнерами, которые специфически связывают такие маркеры. В некоторых вариантах осуществления антитело, или связывающий партнер, может быть конъюгировано, например, непосредственно или опосредованно, с твердой подложкой или матрицей для проведения селекции, такой как магнитная гранула или парамагнитная гранула. Например, CD3<sup>+</sup>, CD28<sup>+</sup> Т-клетки могут быть положительно отобраны с использованием CD3/CD28-



конъюгированных магнитных гранул (например, DYNABEADS<sup>®</sup> M-450 CD3/CD28 T Cell Expander и/или гранул ExpACT<sup>®</sup>).

[0118] В некоторых вариантах осуществления Т-клетки выделяют из образца МКПК путем отрицательной селекции на маркеры, экспрессируемые на не Т-клетках, таких как В-клетки, моноциты или другие белые клетки крови, такие как CD14 клетки. В некоторых аспектах этап селекции на CD4<sup>+</sup> или CD8<sup>+</sup> используют для разделения CD4<sup>+</sup> хелперов и CD8<sup>+</sup> цитотоксических Т-клеток. Такие CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> популяции можно дополнительно сортировать на субпопуляции методом положительной или отрицательной селекции на маркеры, экспрессируемые, или экспрессируемые в относительно высокой степени, на клетках одной или более субпопуляций наивных Т-клеток, Т-клеток памяти и/или эффекторных Т-клеток.

[0119] В некоторых вариантах осуществления CD8<sup>+</sup> клетки дополнительно обогащают или истощают по наивным клеткам, центральным клеткам памяти, эффекторным клеткам памяти и/или центральным стволовым клеткам памяти, например, путем положительной или отрицательной селекции на основе поверхностных антигенов, ассоциированных с соответствующей субпопуляцией. В некоторых вариантах осуществления обогащение по центральным Т-клеткам памяти (TCM) проводят для повышения эффективности, например, для повышения долгосрочной выживаемости, размножения и/или приживления после введения, что в некоторых аспектах является особенно сильным 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 TCM-обогащенных CD8<sup>+</sup> Т-клеток и CD4<sup>+</sup> Т-клеток дополнительно повышает эффективность.

[0120] В вариантах осуществления Т-клетки памяти присутствуют в обоих CD62L<sup>+</sup> и CD62L<sup>-</sup> подмножествах CD8<sup>+</sup> лимфоцитов периферической крови. МКПК можно обогащать или истощать по CD62L<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup> и/или CD62L<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> фракциям, например, с использованием анти-CD8 и анти-CD62L антител.

[0121] В некоторых вариантах осуществления обогащение по центральным Т-клеткам памяти (TCM) основано на наличии, или высокой поверхностной экспрессии, CD45RO, CD62L, CCR7, CD28, CD3 и/или CD127; в некоторых аспектах оно основано на отрицательной селекции на клетки, экспрессирующие, или в высокой степени экспрессирующие, CD45RA и/или гранзим В. В некоторых аспектах выделение CD8<sup>+</sup> популяции, обогащенной по TCM клеткам, проводят путем истощения по клеткам, экспрессирующим CD4, CD14, CD45RA, и положительной селекции, или обогащения, по клеткам, экспрессирующим CD62L. В одном аспекте обогащение по центральным Т-клеткам памяти (TCM) проводят, начиная с отрицательной фракции клеток, отобранных на основе экспрессии CD4, которую подвергают отрицательной селекции на основе экспрессии CD14 и CD45RA, и положительной селекции на основе CD62L. В некоторых аспектах такие виды селекции проводят одновременно, и в других аспектах проводят последовательно, в любом порядке. В некоторых аспектах тот же этап селекции на основе

экспрессии CD4, который используют для получения популяции или субпопуляции CD8<sup>+</sup> клеток, также используют для получения популяции или субпопуляции CD4<sup>+</sup> клеток, так что как положительную, так и отрицательную, фракции, полученные при разделении на основе CD4, сохраняют и используют в последующих этапах способа, необязательно, после одного или более дополнительных этапов положительной или отрицательной селекции. В некоторых вариантах осуществления селекцию на популяцию CD4<sup>+</sup> Т-клеток и селекцию на популяцию CD8<sup>+</sup> Т-клеток проводят одновременно. В некоторых вариантах осуществления селекцию на популяцию CD4<sup>+</sup> Т-клеток и селекцию на популяцию CD8<sup>+</sup> Т-клеток проводят последовательно, в любом порядке. В некоторых вариантах осуществления способы селекции клеток могут включать способы, описанные в опубликованной патентной заявке США № US20170037369. В некоторых вариантах осуществления отобранную популяцию CD4<sup>+</sup> Т-клеток и отобранную популяцию CD8<sup>+</sup> Т-клеток можно объединять после селекции. В некоторых аспектах отобранную популяцию CD4<sup>+</sup> Т-клеток и отобранную популяцию CD8<sup>+</sup> Т-клеток можно объединять в мешке-биореакторе, как описано в настоящем документе.

[0122] В конкретных вариантах осуществления биологический образец, например, образец МКПК или других белых клеток крови, подвергают селекции на CD4<sup>+</sup> клетки, при этом сохраняют как отрицательную, так и положительную, фракции. В конкретных вариантах осуществления CD8<sup>+</sup> Т-клетки выбирают из отрицательной фракции. В некоторых вариантах осуществления биологический образец подвергают селекции на CD8<sup>+</sup> Т-клетки, при этом сохраняют как отрицательную, так и положительную, фракции. В конкретных вариантах осуществления CD4<sup>+</sup> Т-клетки выбирают из отрицательной фракции.

[0123] В конкретном примере образец МКПК или другой образец белых клеток крови подвергают селекции на CD4<sup>+</sup> клетки, при этом сохраняют как отрицательную, так и положительную, фракции. Отрицательную фракцию затем подвергают отрицательной селекции на основе экспрессии CD14 и CD45RA или CD19, и положительной селекции на основе маркера, характерного для центральных Т-клеток памяти, такого как CD62L или CCR7, при этом положительную и отрицательную селекции проводят в любом порядке.

[0124] Хелперные CD4<sup>+</sup> Т-клетки можно сортировать на наивные клетки, центральные клетки памяти и эффекторные клетки путем идентификации клеточных популяций, имеющих клеточные поверхностные антигены. CD4<sup>+</sup> лимфоциты можно получать стандартными методами. В некоторых вариантах осуществления наивные CD4<sup>+</sup> Т лимфоциты представляют собой CD45RO<sup>-</sup>, CD45RA<sup>+</sup>, CD62L<sup>+</sup> или CD4<sup>+</sup> Т-клетки. В некоторых вариантах осуществления центральные CD4<sup>+</sup> клетки памяти представляют собой CD62L<sup>+</sup> и CD45RO<sup>+</sup> клетки. В некоторых вариантах осуществления эффекторные CD4<sup>+</sup> клетки представляют собой CD62L<sup>-</sup> и CD45RO<sup>-</sup> клетки.

[0125] В одном примере для обогащения по CD4<sup>+</sup> клеткам методом отрицательной селекции коктейль моноклональных антител, как правило, включает антитела к CD14, CD20, CD11b, CD16, HLA-DR и CD8. В некоторых вариантах осуществления антитело

или связывающий партнер связаны с твердой подложкой или матрицей, такой как магнитная гранула или парамагнитная гранула, что позволяет разделять клетки для положительной и/или отрицательной селекции. Например, в некоторых вариантах осуществления клетки и клеточные популяции разделяют или выделяют с использованием иммуно-магнитных (или аффино-магнитных) методов разделения (обзор приведен в *Methods in Molecular Medicine*, vol. 58: *Metastasis Research Protocols*, Vol. 2: *Cell Behavior In vitro and In vivo*, p 17-25 под редакцией: S. A. Brooks and U. Schumacher © Humana Press Inc., Totowa, NJ).

[0126] В некоторых аспектах инкубируемый образец или композицию клеток, которые предстоит разделять, инкубируют с селективным реагентом, содержащим мелкий, намагничиваемый или магнитно-чувствительный материал, такой как магнитно-чувствительные частицы или микрочастицы, например, парамагнитные гранулы (например, такие как гранулы DYNABEADS<sup>®</sup> или MACS<sup>®</sup>). Магнитно-чувствительный материал, например, частица, как правило, непосредственно или опосредованно присоединен к связывающему партнеру, например, антителу, которое специфически связывает молекулу, например, поверхностный маркер, находящийся на клетке, клетках, или популяции клеток, которые желательно отделять, например, которые желательно подвергать отрицательной или положительной селекции.

[0127] В некоторых вариантах осуществления магнитная частица или гранула содержит магнитно-чувствительный материал, связанный со специфическим связывающим средством, таким как антитело или другой связывающий партнер. Известно множество магнитно-чувствительных материалов для использования в методах разделения, основанных на магнитных свойствах, например, те, которые описаны в выданном Molday патенте США № 4452773 и в европейской патентной заявке EP 452342 B, которые включены в настоящий документ посредством ссылки. Также можно использовать коллоидные частицы, такие как те, которые описаны в выданном Owen патенте США № 4795698 и в выданном Liberti et al. патенте США № 5200084.

[0128] Инкубацию, как правило, проводят в условиях, в которых антитела или связывающие партнеры, или молекулы, такие как вторичные антитела или другие реагенты, специфически связывающие такие антитела или связывающих партнеров, которые связаны с магнитной частицей или гранулой, специфически связывают клеточные поверхностные молекулы, если они находятся на клетках в образце.

[0129] В конкретных вариантах осуществления магнитно-чувствительные частицы покрыты первичными антителами или другими связывающими партнерами, вторичными антителами, лектинами, ферментами или стрептавидином. В конкретных вариантах осуществления магнитные частицы присоединяют к клеткам за счет покрытия первичными антителами, специфичными для одного или более маркеров. В конкретных вариантах осуществления клетки, а не гранулы, метят первичным антителом или связывающим партнером, а затем добавляют магнитные частицы, покрытые специфичным для клеточного типа вторичным антителом или другим связывающим партнером

(например, стрептавидином). В конкретных вариантах осуществления покрытые стрептавидином магнитные частицы используют в сочетании с биотинилированными первичными или вторичными антителами.

[0130] В некоторых аспектах разделение производят методом, в котором образец помещают в магнитное поле, и те клетки, с которыми связаны магнитно-чувствительные или намагничиваемые частицы, будут притягиваться к магниту и отделяться от немеченых клеток. Для положительной селекции сохраняют клетки, которые притягиваются к магниту; для отрицательной селекции сохраняют клетки, которые не притягиваются (немеченые клетки). В некоторых аспектах используют сочетание положительной и отрицательной селекции во время одного и того же этапа селекции, при этом положительные и отрицательные фракции сохраняют и дополнительно обрабатывают, или подвергают дополнительным этапам разделения.

[0131] В некоторых вариантах осуществления селекцию на основе аффинности проводят методом магнитной сортировки активированных клеток (MACS) (Miltenyi Biotec, Auburn, CA). Системы магнитной сортировки активированных клеток (MACS), например, системы CliniMACS, способны обеспечивать получение после селекции высокочистых клеток с присоединенными к ним намагничиваемыми частицами. В конкретных вариантах осуществления MACS действует в режиме, в котором нецелевые и целевые молекулы последовательно элюируются после наложения внешнего магнитного поля. То есть, клетки, присоединенные к намагничиваемым частицам, удерживаются на месте, в то время как не присоединенные клетки элюируются. Затем, после завершения этого первого этапа элюции, клетки, которые были удержаны в магнитном поле и не были элюированы, определенным образом высвобождаются так, что они могут быть элюированы и извлечены. В конкретных аспектах не целевые клетки метят и удаляют из гетерогенной популяции клеток.

[0132] В некоторых вариантах осуществления магнитно-чувствительные частицы оставляют присоединенными к клеткам, которые впоследствии будут инкубировать, культивировать и/или генетически модифицировать; в некоторых аспектах частицы оставляют присоединенными к клеткам, предназначенным для введения пациенту. В некоторых вариантах осуществления намагничиваемые или магнитно-чувствительные частицы удаляют с клеток. Методы удаления намагничиваемых частиц с клеток известны и включают, например, использование конкурирующих немеченых антител, намагничиваемых частиц или антител, конъюгированных с расщепляемыми линкерами, и так далее. В некоторых вариантах осуществления намагничиваемые частицы являются биоразлагаемыми.

[0133] В некоторых вариантах осуществления выделение и/или селекция приводят 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, извлеченных и/или полученных от одного и того же субъекта.

[0134] В конкретных вариантах осуществления одна или более исходных композиций представляют собой или включают композицию обогащенных Т-клеток, содержащую 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 примерно 100% CD3+ Т-клеток. В конкретном варианте осуществления исходная композиция обогащенных Т-клеток состоит в основном из CD3+ Т-клеток.

[0135] В конкретных вариантах осуществления одна или более исходных композиций представляют собой или включают композицию обогащенных CD4+ Т-клеток, содержащую 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 примерно 100% CD4+ Т-клеток. В конкретных вариантах осуществления исходная композиция CD4+ Т-клеток содержит менее 40%, менее 35%, менее 30%, менее 25%, менее 20%, менее 15%, менее 10%, менее 5%, менее 1%, менее 0,1% или менее 0,01% CD8+ Т-клеток, и/или не содержит CD8+ Т-клетки, и/или свободна, или практически свободна, от CD8+ Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления композиция обогащенных Т-клеток состоит в основном из CD4+ Т-клеток.

[0136] В конкретных вариантах осуществления одна или более композиций представляют собой или включают композицию CD8+ Т-клеток, которая представляет собой или содержит 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 примерно 100% CD8+ Т-клеток. В конкретных вариантах осуществления композиция CD8+ Т-клеток содержит менее 40%, менее 35%, менее 30%, менее 25%, менее 20%, менее 15%, менее 10%, менее 5%, менее 1%, менее 0,1% или менее 0,01% CD4+ Т-клеток, и/или не содержит CD4+ Т-клетки, и/или свободна, или практически свободна, от CD4+ Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления композиция обогащенных Т-клеток состоит в основном из CD8+ Т-клеток.

[0137] В некоторых вариантах осуществления одну или более исходных композиций обогащенных Т-клеток замораживают, например, криоконсервируют и/или криосохраняют, после выделения, селекции и/или обогащения. В некоторых вариантах осуществления одну или более исходных композиций замораживают, например, криоконсервируют и/или криосохраняют, перед любыми этапами инкубации, активации, стимуляции, генетической модификации, трансдукции, трансфекции, культивированию,

размножения, сбора и/или формулирования композиции клеток. В конкретных вариантах осуществления одну или более криоконсервированных исходных композиций хранят, например, при температуре, или при температуре примерно,  $-80^{\circ}\text{C}$ .

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

[0138] В некоторых вариантах осуществления предложенные способы используют для инкубации клеток в стимулирующих условиях. В некоторых вариантах осуществления стимулирующие условия включают условия, которые приводят к активации или стимуляции, и/или способны приводить к активации или стимуляции сигнала в клетке, например, CD4+ Т-клетке, такого как сигнал, генерируемый через TCR и/или корецептор. В некоторых вариантах осуществления стимулирующие условия включают один или более этапов поддержания в культуре, культивирования, инкубации, активации, размножения клеток при добавлении и/или в присутствии стимулирующего реагента, например, реагента, который активирует или стимулирует, и/или способен к активации или стимуляции сигнала в клетке. В некоторых вариантах осуществления стимулирующий реагент стимулирует и/или активирует TCR и/или корецептор. В конкретных вариантах осуществления стимулирующий реагент представляет собой реагент, описанный в разделе I-B-1.

[0139] В конкретных вариантах осуществления одну или более композиций обогащенных Т-клеток инкубируют в стимулирующих условиях до генетической модификации клеток, например, трансфекции и/или трансдукции клеток, например, методом, описанным в разделе I-C. В конкретных вариантах осуществления одну или более композиций обогащенных Т-клеток инкубируют в 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 представляют собой исходные композиции. В конкретных вариантах осуществления одна или более исходных композиций ранее были криоконсервированы и сохранены, и разморожены перед инкубацией.

[0140] В конкретных вариантах осуществления одна или более композиций обогащенных Т-клеток представляют собой или включают две отдельные композиции, например, отдельные исходные композиции, обогащенных Т-клеток. В конкретных вариантах осуществления две отдельные композиции обогащенных Т-клеток, например, две отдельные композиции обогащенных Т-клеток, отобранных, выделенных и/или обогащенных из одного и того же биологического образца, инкубируют в стимулирующих условиях отдельно. В конкретных вариантах осуществления две отдельные композиции включают композицию обогащенных CD4+ Т-клеток. В конкретных вариантах осуществления две отдельные композиции включают композицию обогащенных CD8+ Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления две отдельные композиции обогащенных CD4+ Т-клеток и обогащенных CD8+ Т-клеток отдельно инкубируют в стимулирующих условиях. В некоторых вариантах осуществления одну композицию обогащенных Т-клеток инкубируют в стимулирующих условиях. В конкретных вариантах осуществления

одна композиция представляет собой композицию обогащенных CD4+ Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления одна композиция представляет собой композицию обогащенных CD4+ и CD8+ Т-клеток, которые были объединены из отдельных композиций перед инкубацией.

[0141] В некоторых вариантах осуществления композиция обогащенных CD4+ Т-клеток, которую инкубируют в стимулирующих условиях, содержит 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 примерно 100% CD4+ Т-клеток. В конкретных вариантах осуществления композиция обогащенных CD4+ Т-клеток, которую инкубируют в стимулирующих условиях, содержит менее 40%, менее 35%, менее 30%, менее 25%, менее 20%, менее 15%, менее 10%, менее 5%, менее 1%, менее 0,1% или менее 0,01% CD8+ Т-клеток и/или не содержит CD8+ Т-клетки, и/или свободна, или практически свободна, от CD8+ Т-клеток.

В некоторых вариантах осуществления композиция обогащенных CD8+ Т-клеток, которую инкубируют в стимулирующих условиях, содержит 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 примерно 100% CD8+ Т-клеток. В конкретных вариантах осуществления композиция обогащенных CD8+ Т-клеток, которую инкубируют в стимулирующих условиях, содержит менее 40%, менее 35%, менее 30%, менее 25%, менее 20%, менее 15%, менее 10%, менее 5%, менее 1%, менее 0,1% или менее 0,01% CD4+ Т-клеток и/или не содержит CD4+ Т-клетки, и/или свободна, или практически свободна, от CD4+ Т-клеток.

[0142] В некоторых вариантах осуществления отдельные композиции обогащенных CD4+ и CD8+ Т-клеток объединяют в одну композицию и инкубируют в стимулирующих условиях. В конкретных вариантах осуществления отдельные стимулированные композиции обогащенных CD4+ и обогащенных CD8+ Т-клеток объединяют в одну композицию после проведения и/или завершения инкубации.

[0143] В конкретных вариантах осуществления одну или более композиций обогащенных Т-клеток инкубируют в стимулирующих условиях до генетической модификации клеток, например, трансфекции и/или трансдукции клеток, например, методом, описанным в разделе I-C. В конкретных вариантах осуществления одну или более композиций обогащенных Т-клеток инкубируют в 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 представляют собой исходные композиции. В конкретных вариантах осуществления одна или более исходных композиций ранее были криоконсервированы и сохранены, и разморожены перед инкубацией.

[0144] В некоторых вариантах осуществления инкубация в стимулирующих условиях может включать поддержание в культуре, культивирование, стимуляцию, активацию, размножение, в том числе, путем инкубации в стимулирующих условиях, например, условиях, предназначенных для индукции пролиферации, размножения, активации и/или выживания клеток в популяции, для имитации воздействия антигена и/или для подготовки клеток к генетической модификации, такой как введение рекомбинантного антигенного рецептора. В конкретных вариантах осуществления стимулирующие условия могут включать одно или более из конкретной среды, температуры, содержания кислорода, содержания диоксида углерода, периода времени, средств, например, питательных веществ, аминокислот, антибиотиков, ионов, и/или стимулирующих факторов, таких как цитокины, хемокины, антигены, связывающие партнеры, слитые белки, рекомбинантные растворимые рецепторы, а также любые другие средства, предназначенные для активации клеток.

[0145] В некоторых аспектах стимуляцию и/или инкубацию в стимулирующих условиях проводят методами, такими как методы, описанные в патенте США № 6040177, выданном 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.

[0146] В некоторых вариантах осуществления клетки, например, Т-клетки, композиции клеток и/или популяции клеток, например  $CD4^+$  и  $CD8^+$  Т-клетки, или их композиции, популяции или субпопуляции, размножают путем добавления к иницирующей культуре композиции питающих клеток, таких как неделящиеся моноклеарные клетки периферической крови (МКПК), (например, таким образом, что полученная популяция клеток содержит по меньшей мере примерно 5, 10, 20 или 40, или более, питающих клеток МКПК на каждый Т-лимфоцит в начальной популяции, которая будет размножена); и инкубации культуры (например, в течение периода времени, достаточного для увеличения количества Т-клеток). В некоторых аспектах неделящиеся питающие клетки могут представлять собой гамма-облученные питающие клетки МКПК. В некоторых вариантах осуществления МКПК облучают гамма-лучами в диапазоне доз примерно 3000-3600 рад для предотвращения деления клеток. В некоторых аспектах питающие клетки добавляют в среду для культивирования до добавления популяций Т-клеток.

[0147] В некоторых вариантах осуществления стимулирующие условия включают температуру, подходящую для роста человеческих Т-лимфоцитов, например, по меньшей мере примерно 25 градусов Цельсия, как правило, по меньшей мере примерно 30 градусов, и как правило, точно, или примерно, 37 градусов Цельсия. В некоторых вариантах осуществления температуру изменяют в процессе культивирования, например, с 37 градусов Цельсия до 35 градусов Цельсия. Необязательно, инкубация может дополнительно включать добавление неделящихся EBV-трансформированных лимфобластоидных клеток (LCL) в качестве питающих клеток. LCL могут быть облучены гамма-излучением в диапазоне примерно 6000-10000 рад. В некоторых аспектах



питающие клетки LCL предоставляют в любом подходящем количестве так, что соотношение питающих клеток LCL и исходных Т-лимфоцитов составляет по меньшей мере примерно 10:1.

[0148] В некоторых вариантах осуществления популяции  $CD4^+$  и  $CD8^+$  клеток, которые являются антиген-специфическими, могут быть получены путем стимуляции наивных или антиген-специфических Т-лимфоцитов антигеном. Например, антиген-специфические Т-клеточные линии или клоны могут быть получены к антигенам цитомегаловируса путем получения Т-клеток от инфицированных субъектов и стимуляции клеток *in vitro* тем же антигеном. Также можно использовать наивные Т-клетки.

[0149] В конкретных вариантах осуществления стимулирующие условия включают инкубирование, поддержание в культуре и/или культивирование клеток со стимулирующим реагентом. В конкретных вариантах осуществления стимулирующий реагент представляет собой реагент, описанный в разделе I-B-1. В конкретных вариантах осуществления стимулирующий реагент содержит или включает гранулу. В конкретных вариантах осуществления начало и/или инициация инкубации, поддержания в культуре и/или культивирования клеток в стимулирующих условиях происходит, когда клетки приводят в контакт с, и/или инкубируют с, стимулирующим реагентом. В конкретных вариантах осуществления клетки инкубируют до, в процессе и/или после генетической модификации клеток, например, введения рекомбинантного полинуклеотида в клетку, например, методом трансдукции или трансфекции.

[0150] В некоторых вариантах осуществления композицию обогащенных Т-клеток инкубируют при соотношении стимулирующего реагента и/или гранул и клеток, составляющем, или составляющем примерно, 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 соотношение стимулирующего реагента и/или гранул и клеток 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 соотношение стимулирующего реагента и клеток составляет примерно 1:1 или составляет 1:1.

[0151] В конкретных вариантах осуществления клетки не инкубируют, не приводят в контакт и/или не подвергают воздействию средства, ингибирующего активность mTOR, например, средства, описанного в разделе II, до и/или в процессе инкубации в стимулирующих условиях.

[0152] В конкретных вариантах осуществления по меньшей мере часть инкубации проводят в присутствии средства, ингибирующего активность mTOR, например, средства, описанного в разделе II. В некоторых вариантах осуществления инкубацию целиком и/или полностью проводят в присутствии средства, ингибирующего активность mTOR.

[0153] В конкретных вариантах осуществления клетки инкубируют со стимулирующим реагентом в присутствии средства, ингибирующего активность mTOR. В конкретных вариантах осуществления средство, ингибирующее активность mTOR,

представляет собой средство, описанное в разделе II. В некоторых вариантах осуществления средство, ингибирующее активность mTOR, также ингибирует активность дополнительной киназы. В конкретных вариантах осуществления средство, ингибирующее активность mTOR, также ингибирует активность фосфоинозитол-3-киназы (PI3K). В конкретных вариантах осуществления средство избирательно ингибирует активность mTOR, например, заметно не ингибирует активность PI3K, и/или не ингибирует активность PI3K в такой же степени, как активность mTOR, при концентрациях, достаточных для ингибирования активности mTOR. В некоторых вариантах осуществления средство, ингибирующее активность mTOR, ингибирует активность киназы. В конкретных вариантах осуществления средство, ингибирующее активность mTOR, ингибирует активность mTORC1 и/или mTORC2. В некоторых вариантах осуществления средство, ингибирующее активность mTOR, ингибирует активность mTORC1 и mTORC2.

[0154] В некоторых вариантах осуществления средства включают, но без ограничения, PI103, SF1126, BGT226, XL765, PF-04691502, NVP-BEZ235, пиразолопиримидин, торин 1, торкиниб (PP242), PP30, Ku-0063794, WAY-600 (Wyeth), WAY-687 (Wyeth), WAY-354 (Wyeth), AZD8055, рапамицин (сиролимус), темсиролимус (CC1779), эверолимус (RAD001), дефоролимус (AP23573), AZD8055 (AstraZeneca) и OSI-027 (OSI). В некоторых вариантах осуществления средство, ингибирующее активность mTOR, имеет или включает формулу, приведенную в разделе II, например, формулу (I), формулу (II) или формулу (III). В некоторых вариантах осуществления средство представляет собой соединение 155, соединение 246 или соединение 63.

[0155] В конкретных вариантах осуществления клетки инкубируют в присутствии средства, ингибирующего активность mTOR, в концентрации, которая приводит к ингибированию, уменьшению и/или снижению активности mTOR. В некоторых вариантах осуществления концентрация приводит к ингибированию, уменьшению и/или снижению одной или более активностей mTOR на примерно или по меньшей мере 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99% или 99,9%. В некоторых вариантах осуществления концентрация средства не предотвращает пролиферацию и/или размножение первичных Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления клетки инкубируют в присутствии средства, ингибирующего активность mTOR, в концентрации от 1 нМ до 1 мкМ, от 1 нМ до 100 нМ, от 50 нМ до 200 нМ, от 100 нМ до 250 нМ, от 200 нМ до 500 нМ, от 500 нМ до 1 мкМ, от 1 мкМ до 10 мкМ или от 5 мкМ до 50 мкМ. В конкретных вариантах осуществления клетки инкубируют в присутствии средства, ингибирующего активность mTOR, в концентрации примерно или по меньшей мере 0,1 нМ, 0,5 нМ, 1 нМ, 5 нМ, 10 нМ, 25 нМ, 50 нМ, 100 нМ, 150 нМ, 200 нМ, 250 нМ, 500 нМ, 1 мкМ, 5 мкМ, 10 мкМ, 25 мкМ, 50 мкМ или 100 мкМ.

[0156] В некоторых вариантах осуществления клетки инкубируют в присутствии соединения 155. В конкретных вариантах осуществления клетки инкубируют в присутствии соединения 155 в концентрации от 1 нМ до 1 мкМ, от 1 нМ до 100 нМ, от 50

нМ до 200 нМ, от 100 нМ до 250 нМ или от 200 нМ до 500 нМ. В конкретных вариантах осуществления клетки инкубируют в присутствии соединения 155 в концентрации примерно или по меньшей мере 10 нМ, 25 нМ, 50 нМ, 100 нМ, 150 нМ, 200 нМ, 250 нМ или 500 нМ.

[0157] В конкретных вариантах осуществления клетки инкубируют в присутствии соединения 246. В конкретных вариантах осуществления клетки инкубируют в присутствии соединения 246 в концентрации от 1 нМ до 1 мкМ, от 1 нМ до 100 нМ, от 50 нМ до 200 нМ, от 100 нМ до 250 нМ или от 200 нМ до 500 нМ. В конкретных вариантах осуществления клетки инкубируют в присутствии соединения 246 в концентрации примерно или по меньшей мере 10 нМ, 25 нМ, 50 нМ, 100 нМ, 150 нМ, 200 нМ, 250 нМ или 500 нМ.

[0158] В конкретных вариантах осуществления клетки инкубируют в присутствии соединения 63. В конкретных вариантах осуществления клетки инкубируют в присутствии соединения 63 в концентрации от 1 нМ до 1 мкМ, от 1 нМ до 100 нМ, от 50 нМ до 200 нМ, от 100 нМ до 250 нМ или от 200 нМ до 500 нМ. В некоторых вариантах осуществления клетки инкубируют в присутствии соединения 63 в концентрации примерно или по меньшей мере 10 нМ, 25 нМ, 50 нМ, 100 нМ, 150 нМ, 200 нМ, 250 нМ или 500 нМ.

[0159] В некоторых вариантах осуществления композиции или клетки инкубируют в присутствии стимулирующих условий или стимулирующего средства. Такие условия включают условия, предназначенные для индукции пролиферации, размножения, активации и/или выживания клеток в популяции, для имитации воздействия антигена и/или подготовки клеток для генетической модификации, например, для введения рекомбинантного антигенного рецептора. Иллюстративные стимулирующие реагенты описаны ниже.

[0160] В некоторых вариантах осуществления условия для стимуляции и/или активации могут включать одно или более из конкретной среды, температуры, содержания кислорода, содержания диоксида углерода, периода времени, средств, например, питательных веществ, аминокислот, антибиотиков, ионов и/или стимулирующих факторов, таких как цитокины, хемокины, антигены, связывающие партнеры, слитые белки, рекомбинантные растворимые рецепторы, а также любые другие средства, предназначенные для активации клеток.

[0161] В некоторых аспектах инкубацию проводят методами, такими как методы, описанные в патенте США № 6040177, выданном 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.

[0162] В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере часть инкубации в присутствии одного или более стимулирующих условий или стимулирующих средств проводят во внутренней полости центрифужной камеры, например, при вращении центрифуги, как описано в публикации международной патентной заявки с номером

WO2016/073602. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере часть инкубации, проводимая в центрифужной камере, включает смешивание с реагентом или реагентами, индуцирующими стимуляцию и/или активацию. В некоторых вариантах осуществления клетки, такие как отобранные клетки, помещают в стимулирующие условия или смешивают со стимулирующим средством в центрифужной камере. В некоторых аспектах таких способов некоторый объем клеток смешивают с некоторым количеством одного или более стимулирующих условий или средств, которое намного меньше, чем обычно используемое количество при проведении аналогичной стимуляции в планшете для культивирования клеток или в другой системе.

[0163] В некоторых вариантах осуществления стимулирующее средство добавляют к клеткам в полости камеры в количестве, которое значительно меньше (например, составляет не более 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70% или 80% от количества), чем количество, которое обычно используют, или которое было бы необходимо, для достижения примерно такой же, или аналогичной, эффективности селекции такого же количества клеток или такого же объема клеток при проведении селекции без смешивания в центрифужной камере, например, в пробирке или мешке с периодическим встряхиванием или вращением. В некоторых вариантах осуществления инкубацию проводят с добавлением к клеткам инкубационного буфера и стимулирующего средства для достижения целевого объема при инкубации с реагентом, составляющего, например, от 10 мл до 200 мл, например, по меньшей мере или по меньшей мере примерно 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 инкубационный буфер и стимулирующее средство предварительно смешивают перед добавлением к клеткам. В некоторых вариантах осуществления инкубационный буфер и стимулирующее средство отдельно добавляют к клеткам. В некоторых вариантах осуществления инкубацию для стимуляции проводят в условиях периодического осторожного перемешивания, что может способствовать энергетически благоприятным взаимодействиям и за счет этого позволять использовать, в целом, меньше стимулирующего реагента, достигая при этом стимуляции и активации клеток.

[0164] В некоторых вариантах осуществления инкубацию, как правило, проводят при перемешивании, например, при вращении, как правило, с относительно низким ускорением или скоростью, например, со скоростью, меньшей чем скорость, используемая для осаждения клеток, например, от или от примерно 600 об/мин до 1700 об/мин (например, при или примерно при, или по меньшей мере при 600 об/мин, 1000 об/мин или 1500 об/мин, или 1700 об/мин), например, при ОЦУ для образца или стенки камеры, или другого контейнера, составляющем от или от примерно 80 g до 100 g (например, при или примерно при, или по меньшей мере при 80 g, 85 g, 90 g, 95 g или 100 g). В некоторых вариантах осуществления вращение проводят с повторяющимися интервалами вращения при такой низкой скорости, за которыми следует период покоя, например, вращение и/или покой в течение 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 секунд, например, вращение в течение

примерно 1 или 2 секунд, с последующим покоем в течение примерно 5, 6, 7 или 8 секунд.

[0165] В некоторых вариантах осуществления общая продолжительность инкубации, например, со стимулирующим средством, составляет от или от примерно 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 по меньшей мере примерно 6 часов, 12 часов, 18 часов, 24 часа, 36 часов или 72 часа. В некоторых вариантах осуществления дополнительную инкубацию проводят в течение периода времени от или от примерно 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.

[0166] В конкретных вариантах осуществления стимулирующие условия включают инкубацию, поддержание в культуре и/или культивирование композиции обогащенных Т-клеток с добавлением, и/или в присутствии, одного или более цитокинов. В конкретных вариантах осуществления один или более цитокинов представляют собой рекомбинантные цитокины. В некоторых вариантах осуществления один или более цитокинов представляют собой человеческие рекомбинантные цитокины. В конкретных вариантах осуществления один или более цитокинов связывают, и/или способны связывать, рецепторы, экспрессируемые Т-клетками и/или эндогенные для Т-клеток. В конкретных вариантах осуществления один или более цитокинов представляют собой или включают представителя семейства цитокинов с пучком 4-альфа-спиралей. В некоторых вариантах осуществления представители семейства цитокинов с пучком 4-альфа-спиралей включают, но без ограничения, 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 (G-CSF) и гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (GM-CSF).

[0167] В некоторых вариантах осуществления стимуляция приводит к активации и/или пролиферации клеток, например, перед проведением трансдукции.

### ***1. Стимулирующие Реагенты***

[0168] В некоторых вариантах осуществления инкубация композиции клеток, например, исходных клеток, в стимулирующих условиях представляет собой или включает инкубацию и/или контактирование композиции обогащенных клеток со стимулирующим реагентом, способным вызывать активацию и/или размножение Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления стимулирующий реагент способен к стимуляции и/или активации одного или более сигналов в клетках. В некоторых вариантах осуществления один или более сигналов опосредованы рецептором. В конкретных вариантах осуществления один или более сигналов представляют собой, или связаны с изменением сигнальной трансдукции и/или уровнем или количеством вторичных мессенджеров, например, цАМФ и/или внутриклеточного кальция, изменением количества, клеточной локализации, конформации, фосфорилирования, убиквитинирования и/или укорочением одного или более клеточных белков, и/или изменением клеточной активности, например, транскрипции, трансляции, деградации

белков, клеточной морфологии, состояния активации и/или клеточного деления. 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.

[0169] В конкретных вариантах осуществления стимулирующий реагент содержит частицу, например, гранулу, которая конъюгирована или связана с одним или более средствами, например, биологическими молекулами, которые способны вызывать активацию и/или размножение клеток, например, Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления одно или более средств связаны с гранулой. В некоторых вариантах осуществления гранула является биосовместимой, то есть, состоит из материала, подходящего для биологического применения. В некоторых вариантах осуществления гранулы являются нетоксичными для культивируемых клеток, например, культивируемых Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления гранулы могут представлять собой любые частицы, к которым могут быть присоединены средства таким образом, который допускает взаимодействие между средством и клеткой.

[0170] В некоторых вариантах осуществления стимулирующий реагент содержит одно или более средств, способных вызывать активацию и/или размножение клеток, например, Т-клеток, которые связаны или иным образом присоединены к грануле, например, к поверхности гранулы. В конкретных вариантах осуществления гранула представляет собой неклеточную частицу. В конкретных вариантах осуществления гранула может включать коллоидную частицу, микросферу, наночастицу, магнитную гранулу, или тому подобное. В некоторых вариантах осуществления гранулы представляют собой агарозные гранулы. В конкретных вариантах осуществления гранулы представляют собой сефарозные гранулы.

[0171] В конкретных вариантах осуществления стимулирующий реагент содержит гранулы, которые являются монодисперсными. В конкретных вариантах осуществления гранулы, которые являются монодисперсными, имеют распределение по размерам со стандартным отклонением между диаметрами, составляющим менее 5%.

[0172] В некоторых вариантах осуществления гранула содержит одно или более средств, например, средств, которые соединены, конъюгированы или связаны (непосредственно или опосредованно) с поверхностью гранулы. В некоторых вариантах осуществления средство, предусмотренное по настоящему изобретению, включает, но не ограничивается ими, РНК, ДНК, белки (например, ферменты), антигены, поликлональные антитела, моноклональные антитела, фрагменты антител, углеводы, липиды, лектины или любую другую биологическую молекулу с аффинностью для нужной мишени. В некоторых вариантах осуществления нужная мишень представляет собой Т-клеточный рецептор и/или компонент Т-клеточного рецептора. В конкретных вариантах осуществления нужная мишень представляет собой CD3. В конкретном варианте осуществления нужная мишень представляет собой Т-клеточную костимулирующую

молекулу, например, CD28, CD137 (4-1-BB), OX40 или ICOS. Одно или более средств могут быть присоединены непосредственно или опосредованно к грануле различными способами, известными и доступными в данной области. Соединение может быть ковалентным, не ковалентным, электростатическим или гидрофобным, и может быть осуществлено различными методами присоединения, включая, например, химические методы, механические методы или ферментативные методы. В некоторых вариантах осуществления биологическая молекула (например, биотинилированное анти-CD3 антители) может быть присоединена к грануле опосредованно, через другую биологическую молекулу (например, антители против биотина), которая непосредственно связана с гранулой.

[0173] В некоторых вариантах осуществления стимулирующий реагент содержит гранулу и одно или более средств, которые непосредственно взаимодействуют с макромолекулой на поверхности клетки. В конкретных вариантах осуществления гранула (например, парамагнитная гранула) взаимодействует с клеткой через одно или более средств (например, антители), специфических для одной или более макромолекул на клетке (например, одного или более белков клеточной поверхности). В конкретных вариантах осуществления гранула (например, парамагнитная гранула) мечена первым средством, описанным в настоящем документе, таким как первичное антители (например, антители против биотина) или другая биологическая молекула, а затем добавляют второе средство, такое как вторичное антители (например, биотинилированное анти-CD3 антители), или другую вторичную биологическую молекулу (например, стрептавидин), в результате чего вторичное антители или другая вторичная биологическая молекула специфически связывает такие первичные антители или другую биологическую молекулу на частице.

[0174] В некоторых вариантах осуществления стимулирующий реагент содержит одно или более средств (например, антители), которые присоединены к грануле (например, парамагнитной грануле) и специфически связывают одну или более из следующих макромолекул на клетке (например, Т-клетке): CD2, CD3, CD4, CD5, CD8, CD25, CD27, CD28, CD29, CD31, CD44, CD45RA, CD45RO, CD54 (ICAM-1), CD127, МНСI, МНСII, CTLA-4, ICOS, PD-1, OX40, CD27L (CD70), 4-1BB (CD137), 4-1BBL, CD30L, LIGHT, IL-2R, IL-12R, IL-1R, IL-15R; IFN-гаммаR, TNF-альфаR, IL-4R, IL-10R, CD18/CD11a (LFA-1), CD62L (L-селектин), CD29/CD49d (VLA-4), Notch-лиганд (например, Delta-подобный 1/4, Jagged 1/2 и так далее), CCR1, CCR2, CCR3, CCR4, CCR5, CCR7 и CXCR3, или ее фрагмент, включая соответствующие лиганды этих макромолекул, или их фрагменты. В некоторых вариантах осуществления средство (например, антители), присоединенное к грануле, специфически связывает одну или более из следующих макромолекул на клетке (например, Т-клетке): CD28, CD62L, CCR7, CD27, CD127, CD3, CD4, CD8, CD45RA и/или CD45RO.

[0175] В некоторых вариантах осуществления одно или более из средств, присоединенных к грануле, представляют собой антители. Антители может включать поликлональное антители, моноклональное антители (включая полноразмерные антители,

которые имеют Fc-область иммуноглобулина), композиции антител с полиэпитопной специфичностью, мультиспецифические антитела (например, биспецифические антитела), диатела и одноцепочечные молекулы, а также фрагменты антител (например, Fab, F(ab')<sub>2</sub> и Fv). В некоторых вариантах осуществления стимулирующий реагент представляет собой фрагмент антитела (включающий антигенсвязывающий фрагмент), например, фрагмент Fab, Fab'-SH, Fv, scFv, или (Fab')<sub>2</sub>. Следует понимать, что константные области любого изотипа можно использовать для антител, предусмотренных в настоящем документе, включая константные области IgG, IgM, IgA, IgD и IgE, и что такие константные области могут быть получены из любых антител человека или животных (например, мышей). В некоторых вариантах осуществления средство представляет собой антитело, которое связывает и/или узнает один или более компонентов T-клеточного рецептора. В конкретных вариантах осуществления средство представляет собой анти-CD3 антитело. В конкретных вариантах осуществления средство представляет собой антитело, которое связывает и/или узнает корецептор. В некоторых вариантах осуществления стимулирующий реагент представляет собой анти-CD28 антитело. В некоторых вариантах осуществления гранула имеет диаметр более примерно 0,001 мкм, более примерно 0,01 мкм, более примерно 0,1 мкм, более примерно 1,0 мкм, более примерно 10 мкм, более примерно 50 мкм, более примерно 100 мкм или более примерно 1000 мкм; и не более, чем примерно 1500 мкм. В некоторых вариантах осуществления гранула имеет диаметр от примерно 1,0 мкм до примерно 500 мкм, от примерно 1,0 мкм до примерно 150 мкм, от примерно 1,0 мкм до примерно 30 мкм, от примерно 1,0 мкм до примерно 10 мкм, от примерно 1,0 мкм до примерно 5,0 мкм, от примерно 2,0 мкм до примерно 5,0 мкм или от примерно 3,0 мкм до примерно 5,0 мкм. В некоторых вариантах осуществления гранула имеет диаметр от примерно 3 мкм до примерно 5 мкм. В некоторых вариантах осуществления гранула имеет диаметр по меньшей мере или по меньшей мере примерно, или примерно 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 конкретных вариантах осуществления гранула имеет диаметр, составляющий, или составляющий примерно, 4,5 мкм. В конкретных вариантах осуществления гранула имеет диаметр, составляющий, или составляющий примерно, 2,8 мкм.

[0176] В некоторых вариантах осуществления гранулы имеют плотность более 0,001 г/см<sup>3</sup>, более 0,01 г/см<sup>3</sup>, более 0,05 г/см<sup>3</sup>, более 0,1 г/см<sup>3</sup>, более 0,5 г/см<sup>3</sup>, более 0,6 г/см<sup>3</sup>, более 0,7 г/см<sup>3</sup>, более 0,8 г/см<sup>3</sup>, более 0,9 г/см<sup>3</sup>, более 1 г/см<sup>3</sup>, более 1,1 г/см<sup>3</sup>, более 1,2 г/см<sup>3</sup>, более 1,3 г/см<sup>3</sup>, более 1,4 г/см<sup>3</sup>, более 1,5 г/см<sup>3</sup>, более 2 г/см<sup>3</sup>, более 3 г/см<sup>3</sup>, более 4 г/см<sup>3</sup> или более 5 г/см<sup>3</sup>. В некоторых вариантах осуществления гранулы имеют плотность от примерно 0,001 г/см<sup>3</sup> до примерно 100 г/см<sup>3</sup>, от примерно 0,01 г/см<sup>3</sup> до примерно 50 г/см<sup>3</sup>, от примерно 0,1 г/см<sup>3</sup> до примерно 10 г/см<sup>3</sup>, от примерно 0,1 г/см<sup>3</sup> до примерно 0,5 г/см<sup>3</sup>, от примерно 0,5 г/см<sup>3</sup> до примерно 1 г/см<sup>3</sup>, от примерно 0,5 г/см<sup>3</sup> до примерно 1,5 г/см<sup>3</sup>, от примерно 1 г/см<sup>3</sup> до примерно 1,5 г/см<sup>3</sup>, от примерно 1 г/см<sup>3</sup> до



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

[0177] В конкретных вариантах осуществления множество гранул имеют однородную плотность. В конкретных вариантах осуществления однородная плотность означает, что стандартное отклонение плотности составляет менее 10%, менее 5% или менее 1% от средней плотности гранул.

[0178] В некоторых вариантах осуществления гранулы имеют площадь поверхности от примерно  $0,001 \text{ м}^2$  на каждый грамм частиц ( $\text{м}^2/\text{г}$ ) до примерно  $1000 \text{ м}^2/\text{г}$ , от примерно  $0,010 \text{ м}^2/\text{г}$  до примерно  $100 \text{ м}^2/\text{г}$ , от примерно  $0,1 \text{ м}^2/\text{г}$  до примерно  $10 \text{ м}^2/\text{г}$ , от примерно  $0,1 \text{ м}^2/\text{г}$  до примерно  $1 \text{ м}^2/\text{г}$ , от примерно  $1 \text{ м}^2/\text{г}$  до примерно  $10 \text{ м}^2/\text{г}$ , от примерно  $10 \text{ м}^2/\text{г}$  до примерно  $100 \text{ м}^2/\text{г}$ , от примерно  $0,5 \text{ м}^2/\text{г}$  до примерно  $20 \text{ м}^2/\text{г}$ , от примерно  $0,5 \text{ м}^2/\text{г}$  до примерно  $5 \text{ м}^2/\text{г}$  или от примерно  $1 \text{ м}^2/\text{г}$  до примерно  $4 \text{ м}^2/\text{г}$ . В некоторых вариантах осуществления частицы, или гранулы, имеют площадь поверхности от примерно  $1 \text{ м}^2/\text{г}$  до примерно  $4 \text{ м}^2/\text{г}$ .

[0179] В некоторых вариантах осуществления гранула содержит по меньшей мере один материал на поверхности, или рядом с поверхностью, гранулы, который может быть соединен, связан или конъюгирован со средством. В некоторых вариантах осуществления поверхность гранулы функционализирована, то есть, содержит функциональные группы, которые способны образовывать ковалентную связь со связывающей молекулой, например, полинуклеотидом или полипептидом. В конкретных вариантах осуществления гранула имеет экспонированные на поверхности карбоксильные, amino, гидроксильные, тозилльные, эпокси и/или хлорметильные группы. В конкретных вариантах осуществления гранулы имеют экспонированные на поверхности агарозу и/или сефарозу. В конкретных вариантах осуществления поверхность гранулы содержит присоединенные стимулирующие реагенты, которые могут связывать или присоединять связывающие молекулы. В конкретных вариантах осуществления биологические молекулы представляют собой полипептиды. В некоторых вариантах осуществления гранулы имеют экспонированный на поверхности белок А, белок G или биотин.

[0180] В некоторых вариантах осуществления гранула реагирует на магнитное поле. В некоторых вариантах осуществления гранула представляет собой магнитную гранулу. В некоторых вариантах осуществления магнитная гранула является парамагнитной. В конкретных вариантах осуществления магнитная гранула является суперпарамагнитной. В конкретных вариантах осуществления гранулы не проявляют

какие-либо магнитные свойства, когда на них не действует магнитное поле.

[0181] В конкретных вариантах осуществления гранула имеет магнитное ядро, парамагнитное ядро или суперпарамагнитное ядро. В некоторых вариантах осуществления магнитное ядро содержит металл. В некоторых вариантах осуществления металл может представлять собой, но без ограничения, железо, никель, медь, кобальт, гадолиний, марганец, тантал, цинк, цирконий или любые их сочетания. В конкретных вариантах осуществления магнитное ядро содержит оксиды металла (например, оксиды железа), ферриты (например, ферриты марганца, ферриты кобальта, ферриты никеля и так далее), гематит и металлические сплавы (например, CoTaZn). В некоторых вариантах осуществления магнитное ядро содержит одно или более из феррита, металла, металлического сплава, оксида железа или диоксида хрома. В некоторых вариантах осуществления магнитное ядро содержит элементарное железо или соединение железа. В некоторых вариантах осуществления магнитное ядро содержит 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 содержит оксид железа (например,  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ).

[0182] В конкретных вариантах осуществления гранула содержит магнитное, парамагнитное и/или суперпарамагнитное ядро, которое имеет оболочку, или покрытие, с функционализированной поверхностью. В некоторых вариантах осуществления покрытие может содержать материал, который может включать, но не ограничивается ими, полимер, полисахарид, диоксид кремния, жирную кислоту, белок, углевод, агарозу, сефарозу, или их сочетание. В некоторых вариантах осуществления полимер может представлять собой полиэтиленгликоль, поли(молочную-со-гликолевую кислоту), полиглутаральдегид, полиуретан, полистирол или поливиниловый спирт. В конкретных вариантах осуществления внешняя оболочка, или покрытие, содержит полистирол. В конкретных вариантах осуществления поверхность внешнего покрытия функционализирована.

[0183] В некоторых вариантах осуществления стимулирующий реагент включает гранулу, которая имеет ядро из оксида металла (например, ядро из оксида железа) и покрытие, при этом ядро из оксида металла содержит по меньшей мере один полисахарид (например, декстран), и при этом покрытие содержит 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 представляет собой ядро из коллоидного оксида железа. В конкретных вариантах осуществления одно или более средств включают антитело или его антигенсвязывающий фрагмент. В конкретных вариантах осуществления одно или более средств включают анти-CD3 антитело и анти-CD28 антитело. В некоторых вариантах осуществления стимулирующий реагент включает анти-CD3 антитело, анти-CD28 антитело и антитело против биотина. В некоторых вариантах осуществления стимулирующий реагент включает антитело против биотина. В некоторых вариантах осуществления гранула имеет диаметр от примерно 3 мкм до примерно 10 мкм. В некоторых вариантах осуществления гранула имеет диаметр от примерно 3 мкм до примерно 5 мкм. В конкретных вариантах

осуществления гранула имеет диаметр примерно 3,5 мкм.

[0184] В некоторых вариантах осуществления стимулирующий реагент включает одно или более средств, которые присоединены к грануле, содержащей ядро из оксида металла (например, внутреннее ядро из оксида железа) и покрытие (например, защитное покрытие), при этом покрытие содержит полистирол. В конкретных вариантах осуществления гранулы представляют собой монодисперсные, парамагнитные (например, суперпарамагнитные) гранулы, имеющие парамагнитное (например, суперпарамагнитное) железное ядро, например, ядро, содержащее магнетит ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) и/или маггемит ( $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$ ), и полистирольное покрытие или оболочку. В некоторых вариантах осуществления гранула является не пористой. В некоторых вариантах осуществления гранулы имеют функционализированную поверхность, к которой присоединены одно или более средств. В конкретных вариантах осуществления одно или более средств ковалентно связаны с поверхностью гранул. В некоторых вариантах осуществления одно или более средств включают антитело или его антигенсвязывающий фрагмент. В некоторых вариантах осуществления одно или более средств включают анти-CD3 антитело и анти-CD28 антитело. В некоторых вариантах осуществления одно или более средств включают анти-CD3 антитело и/или анти-CD28 антитело, и антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, способное связывать меченое антитело (например, биотинилированное антитело), такое как меченое анти-CD3 или анти-CD28 антитело. В конкретных вариантах осуществления гранулы имеют плотность примерно  $1,5 \text{ г/см}^3$  и площадь поверхности от примерно  $1 \text{ м}^2/\text{г}$  до примерно  $4 \text{ м}^2/\text{г}$ . В конкретных вариантах осуществления гранулы представляют собой монодисперсные, суперпарамагнитные гранулы, которые имеют диаметр примерно 4,5 мкм и плотность примерно  $1,5 \text{ г/см}^3$ . В некоторых вариантах осуществления гранулы представляют собой монодисперсные, суперпарамагнитные гранулы, которые имеют средний диаметр примерно 2,8 мкм и плотность примерно  $1,3 \text{ г/см}^3$ .

### **С. Генетически модифицированные клетки**

[0185] В некоторых вариантах осуществления способы, предложенные в настоящем документе, используют для генетической модификации одной или более композиций Т-клеток. В конкретных вариантах осуществления генетическая модификация представляет собой или включает введение полинуклеотида, например, полинуклеотида, кодирующего рекомбинантный белок. В конкретных вариантах осуществления рекомбинантные белки представляют собой рекомбинантные рецепторы, такие как рецепторы, описанные в разделе II. Введение молекул нуклеиновой кислоты, кодирующих рекомбинантный белок, такой как рекомбинантный рецептор, в клетку можно выполнять с использованием любого количества известных векторов. Такие векторы включают вирусные и невирусные системы, в том числе лентивирусные и гамма-ретровирусные системы, а также системы на основе транспозонов, такие как системы переноса генов на основе PiggyBac или «спящая красавица». Иллюстративные способы включают способы переноса нуклеиновых кислот, кодирующих рецепторы, в том числе с использованием

вирусной, например, ретровирусной или лентивирусной, трансдукции, транспозонов и электропорации. В некоторых вариантах осуществления генетическая модификация приводит к получению одной или более генетически модифицированных композиций обогащенных Т-клеток.

[0186] В конкретных вариантах осуществления одну или более композиций Т-клеток генетически модифицируют, например, трансдуцируют или трансфицируют, до культивирования клеток, например, в условиях, стимулирующих пролиферацию и/или размножение, например, способом, описанным в разделе I-D. В конкретных вариантах осуществления одну или более композиций обогащенных Т-клеток генетически модифицируют после того, как одна или более композиций были стимулированы, активированы и/или инкубированы в стимулирующих условиях. В конкретных вариантах осуществления одна или более композиций представляют собой стимулированные композиции. В конкретных вариантах осуществления одна или более стимулированных композиций ранее были криоконсервированы и сохранены, и разморожены перед проведением генетической модификации.

[0187] В конкретных вариантах осуществления одна или более композиций стимулированных Т-клеток представляют собой или включают две отдельные стимулированные композиции обогащенных Т-клеток. В конкретных вариантах осуществления две отдельные композиции обогащенных Т-клеток, например, две отдельные композиции обогащенных Т-клеток, которые были отобраны, выделены и/или обогащены из одного и того же биологического образца, генетически модифицируют отдельно. В конкретных вариантах осуществления две отдельные композиции включают композицию обогащенных CD4<sup>+</sup> Т-клеток. В конкретных вариантах осуществления две отдельные композиции включают композицию обогащенных CD8<sup>+</sup> Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления две отдельные композиции обогащенных CD4<sup>+</sup> Т-клеток и обогащенных CD8<sup>+</sup> Т-клеток генетически модифицируют отдельно. В некоторых вариантах осуществления одну композицию обогащенных Т-клеток генетически модифицируют. В конкретных вариантах осуществления одна композиция представляет собой композицию обогащенных CD4<sup>+</sup> Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления одна композиция представляет собой композицию обогащенных CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-клеток, которые были объединены из отдельных композиций перед проведением генетической модификации.

[0188] В некоторых вариантах осуществления композиция обогащенных CD4<sup>+</sup> Т-клеток, которую генетически модифицируют, например, трансдуцируют или трансфицируют, содержит 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 примерно 100% CD4<sup>+</sup> Т-клеток. В конкретных вариантах осуществления композиция обогащенных CD4<sup>+</sup> Т-клеток, которую генетически модифицируют, содержит менее 40%, менее 35%, менее

30%, менее 25%, менее 20%, менее 15%, менее 10%, менее 5%, менее 1%, менее 0,1% или менее 0,01% CD8+ Т-клеток, и/или не содержит CD8+ Т-клетки, и/или свободна, или практически свободна, от CD8+ Т-клеток.

[0189] В некоторых вариантах осуществления композиция обогащенных CD8+ Т-клеток, которую генетически модифицируют, например, трансдуцируют или трансфицируют, содержит 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 примерно 100% CD8+ Т-клеток. В конкретных вариантах осуществления композиция обогащенных CD8+ Т-клеток, которую генетически модифицируют, содержит менее 40%, менее 35%, менее 30%, менее 25%, менее 20%, менее 15%, менее 10%, менее 5%, менее 1%, менее 0,1% или менее 0,01% CD4+ Т-клеток, и/или не содержит CD4+ Т-клетки, и/или свободна, или практически свободна, от CD4+ Т-клеток.

[0190] В некоторых вариантах осуществления отдельные композиции обогащенных CD4+ и CD8+ Т-клеток объединяют в одну композицию и генетически модифицируют, например, трансдуцируют или трансфицируют. В конкретных вариантах осуществления отдельные генетически модифицированные композиции обогащенных CD4+ и обогащенных CD8+ Т-клеток объединяют в одну композицию после проведения и/или завершения генетической модификации.

[0191] В некоторых вариантах осуществления перенос генов осуществляют, сначала стимулируя клетку, например, путем объединения ее со стимулом, индуцирующим такой ответ, как пролиферация, выживание и/или активация, например, измеряемый на основе экспрессии цитокина или маркера активации, с последующей трансдукцией активированных клеток и размножением их в культуре до количеств, достаточных для клинического применения. В конкретных вариантах осуществления перенос генов осуществляют, сначала инкубируя клетки в стимулирующих условиях, например, любым из способов, описанных в разделе I-B.

[0192] В некоторых вариантах осуществления способы генетической модификации осуществляют путем создания контакта одной или более клеток композиции с молекулой нуклеиновой кислоты, кодирующей рекомбинантный белок, например, рекомбинантный рецептор. В некоторых вариантах осуществления контакт создают с использованием центрифугирования, например, спинокуляции (например, инокуляции в центрифуге). Такие способы включают любые из способов, описанных в публикации международной патентной заявки с номером WO2016/073602. Иллюстративные центрифужные камеры включают камеры, изготавливаемые и поставляемые Biosafe SA, включая камеры, предназначенные для использования с системой Serax<sup>®</sup> и Serax<sup>®</sup> 2, в том числе, центрифужные камеры A-200/F и A-200 и различные наборы для использования с такими системами. Иллюстративные камеры, системы, а также оборудование и шкафы для обработки, описаны, например, в патенте США № 6123655, патенте США № 6733433 и

публикации патентной заявка США № US 2008/0171951, а также публикации международной патентной заявки № WO 00/38762, содержание всех из которых включено в настоящий документ посредством ссылки в полном объеме. Иллюстративные наборы для использования с такими системами включают, но без ограничения, наборы одноразового использования, поставляемые компанией BioSafe SA под торговыми названиями CS-430.1, CS-490.1, CS-600.1 или CS-900.2.

[0193] В некоторых вариантах осуществления клетки не инкубируют, не приводят в контакт и/или не подвергают воздействию средства, ингибирующего активность mTOR, например, средства, описанного в разделе II, до и/или в процессе генетической модификации.

[0194] В конкретных вариантах осуществления по меньшей мере часть генетической модификации проводят в присутствии средства, ингибирующего активность mTOR, такого как средство, описанное в настоящем документе, например, средство, описанное в разделе II. В некоторых вариантах осуществления этап генетической модификации целиком и/или полностью проводят в присутствии средства, ингибирующего активность mTOR.

[0195] В конкретных вариантах осуществления клетки генетически модифицируют, например, трансдуцируют или трансфицируют, в присутствии средства, ингибирующего активность mTOR. В конкретных вариантах осуществления средство, ингибирующее активность mTOR, представляет собой средство, описанное в настоящем документе, например, в разделе II, например, соединение 63. В некоторых вариантах осуществления средство, ингибирующее активность mTOR, также ингибирует активность дополнительной киназы. В конкретных вариантах осуществления средство, ингибирующее активность mTOR, также ингибирует активность фосфоинозитол-3-киназы (PI3K). В конкретных вариантах осуществления средство избирательно ингибирует активность mTOR, например, заметно не ингибирует активность PI3K, и/или не ингибирует активность PI3K в такой же степени, как активность mTOR, при концентрациях, достаточных для ингибирования активности mTOR. В некоторых вариантах осуществления средство, ингибирующее активность mTOR, ингибирует активность киназы. В конкретных вариантах осуществления средство, ингибирующее активность mTOR, ингибирует активность mTORC1 и/или mTORC2. В некоторых вариантах осуществления средство, ингибирующее активность mTOR, ингибирует активность mTORC1 и mTORC2.

[0196] В некоторых вариантах осуществления средства включают, но без ограничения, PI103, SF1126, BGT226, XL765, PF-04691502, NVP-BEZ235, пиразолопиримидин, торин 1, торкиниб (PP242), PP30, Ku-0063794, WAY-600 (Wyeth), WAY-687 (Wyeth), WAY-354 (Wyeth), AZD8055, рапамицин (сиролимус), темсиролимус (CC1779), эверолимус (RAD001), дефоролимус (AP23573), AZD8055 (AstraZeneca) и OSI-027 (OSI). В некоторых вариантах осуществления средство, ингибирующее активность mTOR, имеет или включает формулу, приведенную в разделе II, например, формулу (I),

формулу (II) или формулу (III). В некоторых вариантах осуществления средство представляет собой соединение 155, соединение 246 или соединение 63. В некоторых вариантах осуществления средство представляет собой соединение 63.

[0197] В конкретных вариантах осуществления клетки генетически модифицируют в присутствии средства, ингибирующего активность mTOR, в концентрации, которая приводит к ингибированию, уменьшению и/или снижению активности mTOR. В некоторых вариантах осуществления концентрация приводит к ингибированию, уменьшению и/или снижению одной или более активностей mTOR на примерно или по меньшей мере 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99% или 99,9%. В некоторых вариантах осуществления концентрация средства не предотвращает пролиферацию и/или размножение первичных Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления клетки генетически модифицируют в присутствии средства, ингибирующего активность mTOR, в концентрации от 1 нМ до 1 мкМ, от 1 нМ до 100 нМ, от 50 нМ до 200 нМ, от 100 нМ до 250 нМ, от 200 нМ до 500 нМ, от 500 нМ до 1 мкМ, от 1 мкМ до 10 мкМ или от 5 мкМ до 50 мкМ. В конкретных вариантах осуществления клетки генетически модифицируют в присутствии средства, ингибирующего активность mTOR, в концентрации примерно или по меньшей мере 0,1 нМ, 0,5 нМ, 1 нМ, 5 нМ, 10 нМ, 25 нМ, 50 нМ, 100 нМ, 150 нМ, 200 нМ, 250 нМ, 500 нМ, 1 мкМ, 5 мкМ, 10 мкМ, 25 мкМ, 50 мкМ или 100 мкМ.

[0198] В некоторых вариантах осуществления клетки генетически модифицируют в присутствии соединения 155. В конкретных вариантах осуществления клетки генетически модифицируют в присутствии соединения 155 в концентрации от 1 нМ до 1 мкМ, от 1 нМ до 100 нМ, от 50 нМ до 200 нМ, от 100 нМ до 250 нМ или от 200 нМ до 500 нМ. В конкретных вариантах осуществления клетки генетически модифицируют в присутствии соединения 155 в концентрации примерно или по меньшей мере 10 нМ, 25 нМ, 50 нМ, 100 нМ, 150 нМ, 200 нМ, 250 нМ или 500 нМ.

[0199] В конкретных вариантах осуществления клетки генетически модифицируют в присутствии соединения 246. В конкретных вариантах осуществления клетки генетически модифицируют в присутствии соединения 246 в концентрации от 1 нМ до 1 мкМ, от 1 нМ до 100 нМ, от 50 нМ до 200 нМ, от 100 нМ до 250 нМ или от 200 нМ до 500 нМ. В конкретных вариантах осуществления клетки генетически модифицируют в присутствии соединения 246 в концентрации примерно или по меньшей мере 10 нМ, 25 нМ, 50 нМ, 100 нМ, 150 нМ, 200 нМ, 250 нМ или 500 нМ.

[0200] В конкретных вариантах осуществления клетки генетически модифицируют в присутствии соединения 63. В конкретных вариантах осуществления клетки генетически модифицируют в присутствии соединения 63 в концентрации от 1 нМ до 1 мкМ, от 1 нМ до 100 нМ, от 50 нМ до 200 нМ, от 100 нМ до 250 нМ или от 200 нМ до 500 нМ. В некоторых вариантах осуществления клетки генетически модифицируют в присутствии соединения 63 в концентрации примерно или по меньшей мере 10 нМ, 25 нМ, 50 нМ, 100 нМ, 150 нМ, 200 нМ, 250 нМ или 500 нМ.

[0201] В некоторых вариантах осуществления контакт создают с использованием центрифугирования, например, спинокуляции (например, инокуляции в центрифуге). В некоторых вариантах осуществления композицию, содержащую клетки, вирусные частицы и реагент, можно вращать, как правило, с относительно низким ускорением или скоростью, например, со скоростью, меньшей чем скорость, используемая для осаждения клеток, например, от или от примерно 600 об/мин до 1700 об/мин (например, при или примерно при, или по меньшей мере при 600 об/мин, 1000 об/мин или 1500 об/мин, или 1700 об/мин). В некоторых вариантах осуществления вращение производят с ускорением, например, относительным центробежным ускорением, составляющим от или от примерно 100 g до 3200 g (например, при или примерно при, или по меньшей мере при или примерно при 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 полости. Термин «относительное центробежное ускорение», или ОЦУ, как правило, означает эффективную силу, прилагаемую к 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 в сравнении с осью вращения. Данное значение можно определять с использованием хорошо известных формул, учитывая силу тяжести, скорость вращения и радиус вращения (расстояние от оси вращения до объекта, вещества или частицы, на которых измеряют ОЦУ).

[0202] В некоторых вариантах осуществления введение проводят путем создания контакта одной или более клеток композиции с молекулой нуклеиновой кислоты, кодирующей рекомбинантный белок, например, рекомбинантный рецептор. В некоторых вариантах осуществления контакт создают с использованием центрифугирования, например, спинокуляции (например, инокуляции в центрифуге). Такие способы включают любые из способов, описанных в публикации международной патентной заявки с номером WO2016/073602. Иллюстративные центрифужные камеры включают камеры, изготавливаемые и поставляемые Biosafe SA, включая камеры, предназначенные для использования с системой Sерах<sup>®</sup> и Sерах<sup>®</sup> 2, в том числе, центрифужные камеры A-200/F и A-200 и различные наборы для использования с такими системами. Иллюстративные камеры, системы, а также оборудование и шкафы для обработки, описаны, например, в патенте США № 6123655, патенте США № 6733433 и публикации патентной заявка США № US 2008/0171951, а также публикации международной патентной заявки № WO 00/38762, содержание всех из которых включено в настоящий документ посредством ссылки в полном объеме. Иллюстративные наборы для использования с такими системами включают, но без ограничения, наборы одноразового использования, поставляемые компанией BioSafe SA под торговыми названиями CS-430.1, CS-490.1, CS-600.1 или CS-900.2.

[0203] В некоторых вариантах осуществления система соединена и/или связана с другим оборудованием, включая оборудование, предназначенное для управления, автоматизации, контролирования и/или мониторинга аспектов этапа трансдукции и



одного или более различных других этапов обработки, проводимых в системе, например, одного или более этапов обработки, которые можно проводить совместно, или в сочетании, с системой центрифужных камер, как описано в настоящем документе или в публикации международной патентной заявки с номером WO2016/073602. В некоторых вариантах осуществления это оборудование находится в шкафу. В некоторых вариантах осуществления оборудование включает шкаф, который включает корпус, содержащий схему управления, центрифугу, крышку, двигатели, насосы, датчики, дисплеи и пользовательский интерфейс. Иллюстративное устройство описано в патенте США № 6123655, патенте США № 6733433 и US 2008/0171951.

[0204] В некоторых вариантах осуществления система включает серию контейнеров, например, мешков, трубки, запорные краны, зажимы, разъемы и центрифужную камеру. В некоторых вариантах осуществления контейнеры, такие как мешки, включают один или более контейнеров, таких как мешки, содержащих клетки, которые будут трансдуцированы, и вирусные векторные частицы в одном и том же контейнере или в разных контейнерах, например, в одном и том же мешке или в разных мешках. В некоторых вариантах осуществления система также включает один или более контейнеров, таких как мешки, содержащих среду, такую как разбавитель и/или промывающий раствор, который заливают в камеру, и/или другие компоненты для разбавления, ресуспендирования и/или промывания компонентов и/или композиций при применении способов. Контейнеры могут быть соединены в одном или более положениях в системе, например, в положении, соответствующем входной линии, линии подачи разбавителя, линии промывки, спускной линии и/или выходной линии.

[0205] В некоторых вариантах осуществления камера связана с центрифугой, которая способна осуществлять вращение камеры, например, вокруг ее оси вращения. Вращение может происходить до, в процессе и/или после инкубации, связанной с трансдукцией клеток, и/или в процессе одного или более других этапов обработки. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления один или более из разных этапов обработки проводят при вращении, например, с определенным ускорением. Камера, как правило, способна к вертикальному или в основном вертикальному вращению, так, что камера расположена вертикально во время центрифугирования, и боковая стенка и ось являются вертикальными или в основном вертикальными, при этом конец стенки(стенок) является горизонтальным или в основном горизонтальным.

[0206] В некоторых вариантах осуществления композицию, содержащую клетки, векторные, например, вирусные, частицы и реагент, можно вращать, как правило, с относительно низким ускорением или скоростью, например, со скоростью, меньшей чем скорость, используемая для осаждения клеток, например, от или от примерно 600 об/мин до 1700 об/мин (например, при или примерно при, или по меньшей мере при 600 об/мин, 1000 об/мин или 1500 об/мин или 1700 об/мин). В некоторых вариантах осуществления вращение производят с ускорением, например, относительным центробежным ускорением, составляющим от или от примерно 100 g до 3200 g (например, при или

примерно при, или по меньшей мере при или примерно при 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 полости. Термин «относительное центробежное ускорение», или ОЦУ, как правило, означает эффективную силу, прилагаемую к 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 в сравнении с осью вращения. Данное значение можно определять с использованием хорошо известных формул, учитывая силу тяжести, скорость вращения и радиус вращения (расстояние от оси вращения до объекта, вещества или частицы, на которых измеряют ОЦУ).

[0207] В некоторых вариантах осуществления на протяжении по меньшей мере части генетической модификации, например, трансдукции, и/или после генетической модификации клетки переносят в мешок-биореактор для культивирования генетически модифицированных клеток, например, для культивирования или размножения клеток, как описано выше.

[0208] Также предложены один или более полинуклеотидов (например, молекул нуклеиновой кислоты), кодирующих рекомбинантные рецепторы, векторы для генетической модификации клеток для экспрессии рецепторов и способы получения генетически модифицированных клеток. В некоторых вариантах осуществления вектор содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую рекомбинантный рецептор. В конкретных вариантах осуществления вектор представляет собой вирусный вектор или невирусный вектор. В некоторых случаях вектор представляет собой вирусный вектор, такой как ретровирусный вектор, например, лентивирусный вектор или гамма-ретровирусный вектор.

[0209] В некоторых вариантах осуществления векторы включают вирусные векторы, например, ретровирусные или лентивирусные, невирусные векторы или транспозоны, например, систему транспозонов «спящая красавица», векторы, полученные из обезьяньего вируса 40 (SV40), аденовирусов, аденоассоциированного вируса (AAV), лентивирусные векторы или ретровирусные векторы, такие как гамма-ретровирусные векторы, ретровирусный вектор, полученный из вируса мышинового лейкоза Молони (MoMLV), вируса миелопролиферативной саркомы (MPSV), вируса мышинных эмбриональных стволовых клеток (MESV), вируса мышинных стволовых клеток (MSCV), вируса некроза селезенки (SFFV) или аденоассоциированного вируса (AAV).

[0210] В некоторых вариантах осуществления векторная вирусная 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 выключения гена, заключенные в капсид транспозоны, гомологичную двухцепочечную нуклеиновую кислоту, например, для геномной рекомбинации, или репортерные гены (например, гены флуоресцентных белков,

таких как GFP или люцифераза).

### **1. Вирусные векторные частицы**

[0211] В некоторых вариантах осуществления рекомбинантные нуклеиновые кислоты переносят в клетки с использованием рекомбинантных инфекционных вирусных частиц, таких как, например, векторы, полученные из обезьяньего вируса 40 (SV40), аденовирусов, аденоассоциированного вируса (AAV). В некоторых вариантах осуществления рекомбинантные нуклеиновые кислоты переносят в Т-клетки с использованием рекомбинантных лентивирусных векторов или ретровирусных векторов, таких как гамма-ретровирусные векторы (смотри, 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).

[0212] В некоторых вариантах осуществления ретровирусный вектор содержит последовательность длинного концевой повтора (LTR), например, ретровирусный вектор, полученный из вируса мышинного лейкоза Молони (MoMLV), вируса миелопролиферативной саркомы (MPSV), вируса мышинных эмбриональных стволовых клеток (MESV), вируса мышинных стволовых клеток (MSCV), вируса некроза селезенки (SFFV), или аденоассоциированный вирус (AAV). Большинство ретровирусных векторов получены из мышинных ретровирусов. В некоторых вариантах осуществления ретровирусы включают те, которые получены из клеток любых птиц или млекопитающих. Ретровирусы, как правило, являются амфотропными, это означает, что они способны инфицировать клетки-хозяева нескольких видов, включая человека. В одном варианте осуществления ген, который будет экспрессироваться, заменяет последовательности ретровирусных генов gag, pol и/или env. Были описаны различные иллюстративные ретровирусные системы (смотри, например, патенты США №№ 5219740; 6207453; 5219740; Miller and Rosman, *BioTechniques*, 7:980-990 (1989); Miller, A. D. *Human Gene Therapy*, 1:5-14 (1990); Scarpa et al. *Virology*, 180:849-852 (1991); Burns et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:8033-8037 (1993); и Boris-Lawrie and Temin, *Cur. Opin. Genet. Develop.*, 3:102-109 (1993).

[0213] Методы лентивирусной трансдукции известны. Иллюстративные методы описаны, например, в публикациях Wang et al., *J. Immunother.*, 35(9): 689-701 (2012); Cooper et al. *Blood*. 101:1637-1644 (2003); Verhoeven et al., *Methods Mol Biol.*, 506: 97-114 (2009); и Cavalieri et al., *Blood.*, 102(2): 497-505 (2003).

[0214] 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, например, CAR, содержится и/или расположена между последовательностями 5' LTR и 3' LTR векторного генома.

[0215] В некоторых вариантах осуществления геном вирусного вектора

представляет собой геном лентивируса, например, геном HIV-1 или геном SIV. 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 №№ 6013516 и 5994136). В некоторых вариантах осуществления эти вирусные векторы имеют в основе плазмиду или вирус, и спроектированы для содержания необходимых последовательностей для включения чужеродной нуклеиновой кислоты, для селекции 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 («АТСС»; 10801 University Blvd., Manassas, Va. 20110-2209), или выделены из известных источников общедоступными методами.

[0216] Неограничивающие примеры лентивирусных векторов включают векторы, полученные из такого лентивируса, как вирус иммунодефицита человека 1 (HIV-1), HIV-2, вирус иммунодефицита обезьян (SIV), человеческий Т-лимфотропный вирус 1 (HTLV-1), HTLV-2 или вирус инфекционной анемии лошадей (E1AV). Например, лентивирусные векторы были получены путем многократного ослабления генов вирулентности HIV, например, гены *env*, *vif*, *vpr*, *vpr* и *nef* удаляют, что делает вектор более безопасным для терапевтических целей. Лентивирусные векторы известны в данной области, см. Naldini et al., (1996 и 1998); Zufferey et al., (1997); Dull et al., 1998, патенты США №№ 6013516 и 5994136). В некоторых вариантах осуществления эти вирусные векторы имеют в основе плазмиду или вирус, и спроектированы для содержания необходимых последовательностей для включения чужеродной нуклеиновой кислоты, для селекции 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 («АТСС»; 10801 University Blvd., Manassas, Va. 20110-2209), или выделены из известных источников общедоступными методами.

[0217] В некоторых вариантах осуществления геном вирусного вектора может содержать последовательности 5' и 3' LTR из ретровируса, такого как лентивирус. В некоторых аспектах геном вирусного конструктора может содержать последовательности из 5' и 3' LTR лентивируса и, в частности, может содержать последовательности R и U5 из 5' LTR лентивируса и инактивированную или самоинактивирующую 3' LTR из лентивируса. Последовательности LTR могут представлять собой последовательности LTR из любого лентивируса любых биологических видов. Например, она могут представлять собой последовательности LTR из HIV, SIV, FIV или BIV. Как правило, последовательности LTR представляют собой последовательности LTR HIV.

[0218] В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота вирусного вектора, такого как вирусный вектор HIV, лишена дополнительных транскрипционных единиц. Векторный геном может содержать инактивированную или самоинактивирующую 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 продуцирования вирусной векторной РНК, может быть использована для получения самоинактивируемых (SIN) векторов. Эта делеция затем может быть перенесена в 5' LTR провирусной ДНК в процессе обратной транскрипции. Самоинактивируемый вектор, как правило, имеет делецию последовательностей энхансера и промотора из 3' длинного концевой повтора (LTR), которая копируется в 5' LTR в процессе интеграции вектора. В некоторых вариантах осуществления может быть элиминирована достаточная последовательность, включая удаление ТАТА-бокса, для ликвидации транскрипционной активности LTR. Это может предотвращать продуцирование полноразмерной векторной РНК в трансдуцированных клетках. В некоторых аспектах U3 элемент 3' LTR содержит делецию его последовательности энхансера, ТАТА-бокса, Sp1 и NF-каппа В сайтов. В результате самоинактивирующей 3' LTR провирус, который образуется после вхождения в клетку и обратной транскрипции, содержит инактивированную 5' LTR. Это может повышать безопасность за счет снижения риска мобилизации векторного генома и влияния LTR на находящиеся рядом клеточные промоторы. Самоинактивирующая 3' LTR может быть сконструирована любым методом, известным в данной области. В некоторых вариантах осуществления это не влияет на титры вектора или на *in vitro*, или *in vivo*, свойства вектора.

[0219] Необязательно, последовательность U3 из лентивирусного 5' LTR может быть заменена последовательностью промотора в вирусном конструкте, например, гетерологичной последовательностью промотора. Это может приводить к повышению титра вируса, извлеченного из линии клеток-упаковщиков. Также может быть включена последовательность энхансера. Можно использовать любое сочетание энхансера/промотора, которое приводит к повышению экспрессии вирусного РНК-генома в линии клеток-упаковщиков. В одном примере используют последовательность энхансера/промотора CMV (патент США № 5385839 и патент США № 5168062).

[0220] В конкретных вариантах осуществления риск инсерционного мутагенеза может быть сведен к минимуму за счет конструирования дефектного по интеграции ретровирусного векторного генома, например, лентивирусного векторного генома. Можно использовать множество подходов для получения не интегрирующего векторного генома. В некоторых вариантах осуществления можно вводить мутацию(и) в компонент фермента интегразы в гене *pol* так, что он будет кодировать белок с неактивной интегразой. В некоторых вариантах осуществления сам векторный геном может быть модифицирован для предотвращения интеграции путем, например, мутации или делеции одного или обоих сайтов присоединения, или лишения функциональности 3' LTR-проксимального полипуринового тракта (PPT) за счет делеции или модификации. В некоторых вариантах осуществления могут быть использованы не генетические подходы; они включают использование фармакологических средств, которые ингибируют одну или более функций интегразы. Подходы не являются взаимоисключающими; то есть, одновременно можно использовать более одного из них. Например, как интегразы, так и сайты присоединения,

могут быть нефункциональными, или интегразы и РРТ сайт могут быть нефункциональными, или сайты присоединения и РРТ сайт могут быть нефункциональными, или все из них могут быть нефункциональными. Такие методы и вирусные векторные геномы известны и доступны (смотри 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).

[0221] В некоторых вариантах осуществления вектор содержит последовательности для размножения в клетке-хозяине, например, в прокариотической клетке-хозяине. 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, которые содержат прокариотическую точку начала репликации, также могут содержать ген, экспрессия которого обеспечивает обнаруживаемый или селективный маркер, например, устойчивость к лекарственному средству.

[0222] Вирусный векторный геном, как правило, конструируют в форме плазмиды, которая может быть трансфицирована в линию клеток-упаковщиков или продуцентов. Можно использовать любой из множества известных способов для продуцирования ретровирусных частиц, геном которых содержит РНК-копию вирусного векторного генома. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере два компонента участвуют в создании системы вирусной доставки генов: во-первых, упаковывающие плазмиды, охватывающие структурные белки, а также ферменты, необходимые для создания вирусной векторной частицы, и во-вторых, сам вирусный вектор, то есть, генетический материал, который будет перенесен. В конструкцию одного или обоих из этих компонентов можно вводить элементы, обеспечивающие биологическую безопасность.

[0223] В некоторых вариантах осуществления упаковывающая плазида может содержать все белки ретровируса, такого как HIV-1, кроме белков оболочки (Naldini et al., 1998). В других вариантах осуществления вирусные векторы могут быть лишены дополнительных вирусных генов, таких как гены, связанные с вирулентностью, например, *vpr*, *vif*, *vpr* и *nef*, и/или *Tat*, основной трансактиватор HIV. В некоторых вариантах осуществления лентивирусные векторы, такие как лентивирусные векторы на основе HIV, содержат только три гена родительского вируса: *gag*, *pol* и *rev*, что уменьшает или устраняет возможность восстановления вируса дикого типа за счет рекомбинации.

[0224] В некоторых вариантах осуществления вирусный векторный геном вводят в упаковывающие клетки, которые содержат все компоненты, необходимые для упаковки вирусной геномной РНК, транскрибированной с вирусного векторного генома, в вирусные частицы. Альтернативно, вирусный векторный геном может содержать один или более генов, кодирующих вирусные компоненты, в дополнение к одной или более последовательностям, например, интересующим рекомбинантным нуклеиновым

кислотам. Однако в некоторых аспектах с целью предотвращения репликации генома в клетке-мишени эндогенные вирусные гены, необходимые для репликации, удаляют и предоставляют отдельно в линии клеток-упаковщиков.

[0225] В некоторых вариантах осуществления клетки-упаковщики трансфицируют одним или более плазмидными векторами, содержащими компоненты, необходимые для создания частиц. В некоторых вариантах осуществления клетки-упаковщики трансфицируют плазмидой, содержащей вирусный векторный геном, включая LTR, действующую в цис-положении последовательность для упаковки и интересующую последовательность, то есть нуклеиновую кислоту, кодирующую антигенный рецептор, такой как CAR; а также одной или более хелперными плазидами, кодирующими ферментативные и/или структурные компоненты вируса, такие как gag, pol и/или rev. В некоторых вариантах осуществления используют несколько векторов для разделения различных генетических компонентов, которые образуют ретровирусные векторные частицы. В некоторых таких вариантах осуществления введение отдельных векторов в клетки-упаковщики уменьшает вероятность событий рекомбинации, которые в противном случае могли бы привести к созданию репликативно-компетентных вирусов. В некоторых вариантах осуществления можно использовать один плазмидный вектор, содержащий все из ретровирусных компонентов.

[0226] В некоторых вариантах осуществления ретровирусную векторную частицу, такую как лентивирусная векторная частица, псевдотипируют для повышения эффективности трансдукции клеток-хозяев. Например, ретровирусную векторную частицу, такую как лентивирусная векторная частица, в некоторых вариантах осуществления псевдотипируют гликопротеином VSV-G, который обеспечивает широкий диапазон клеток-хозяев, расширяющий список типов клеток, которые могут быть трансдуцированы. В некоторых вариантах осуществления линейные клетки-упаковщики трансфицируют плазмидой или полинуклеотидом, кодирующим неприродный гликопротеин оболочки, с целью включения ксенотропных, политропных или амфотропных оболочек, например, оболочки вируса синдбис, GALV или VSV-G.

[0227] В некоторых вариантах осуществления линейные клетки-упаковщики предоставляют компоненты, в том числе вирусные регуляторные и структурные белки, которые необходимы в транс-положении для упаковки вирусной геномной РНК в лентивирусные векторные частицы. В некоторых вариантах осуществления линейные клетки-упаковщики могут представлять собой любые линейные клетки, способные экспрессировать лентивирусные белки и продуцировать функциональные лентивирусные векторные частицы. В некоторых аспектах подходящие линии клеток-упаковщиков 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).

[0228] В некоторых вариантах осуществления линейные клетки-упаковщики стабильно экспрессируют вирусный белок(ки). Например, в некоторых аспектах можно конструировать линейные клетки-упаковщики, содержащие gag, pol, rev и/или другие

структурные гены, но без LTR и упаковывающих компонентов. В некоторых вариантах осуществления линейные клетки-упаковщики можно временно трансфицировать молекулами нуклеиновой кислоты, кодирующими один или более вирусных белков, наряду с вирусным векторным геном, содержащим молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую гетерологичный белок, и/или нуклеиновой кислоты, кодирующей гликопротеин оболочки.

[0229] В некоторых вариантах осуществления вирусные векторы и упаковывающие и/или хелперные плазмиды вводят путем трансфекции или инфекции в линейные клетки-упаковщики. Линейные клетки-упаковщики продуцируют вирусные векторные частицы, содержащие вирусный векторный геном. Методы трансфекции или инфекции хорошо известны. Неограничивающие примеры включают методы с использованием фосфата кальция, ДЭАЭ-декстрана, а также методы липофекции, электропорации и микроинъекции.

[0230] Когда рекомбинантную плазмиду, а также ретровирусные LTR и последовательности для упаковки, вводят в клетки определенной линии (например, методом осаждения с фосфатом кальция), последовательности для упаковки могут обеспечивать упаковку РНК-транскрипта с рекомбинантной плазмиды в вирусные частицы, которые затем могут секретироваться в среду для культивирования. Затем, в некоторых вариантах осуществления, среду, содержащую рекомбинантные ретровирусы, собирают, необязательно, концентрируют и используют для переноса генов. Например, в некоторых аспектах после совместной трансфекции упаковывающих плазмид и вектора для переноса в линейные клетки-упаковщики, вирусные векторные частицы извлекают из среды для культивирования и титруют стандартными методами, используемыми специалистами в данной области.

[0231] В некоторых вариантах осуществления ретровирусный вектор, такой как лентивирусный вектор, могут продуцировать линейные клетки-упаковщики, такие как иллюстративные клетки линии НЕК 293Т, при введении плазмид, обеспечивающих образование лентивирусных частиц. В некоторых вариантах осуществления клетка-упаковщик трансфицирована и/или содержит полинуклеотид, кодирующий gag и pol, и полинуклеотид, кодирующий рекомбинантный рецептор, такой как антигенный рецептор, например, CAR. В некоторых вариантах осуществления линейная клетка-упаковщик, необязательно и/или дополнительно, трансфицирована и/или содержит полинуклеотид, кодирующий белок rev. В некоторых вариантах осуществления линейная клетка-упаковщик, необязательно и/или дополнительно, трансфицирована и/или содержит полинуклеотид, кодирующий неприродный гликопротеин оболочки, например, VSV-G. В некоторых таких вариантах осуществления примерно через два дня после трансфекции клеток, например, клеток НЕК 293Т, клеточный супернатант содержит рекомбинантные лентивирусные векторы, которые можно извлекать и титровать.

[0232] Извлеченные и/или продуцированные ретровирусные векторные частицы можно использовать для трансдукции клеток-мишеней описанными методами. После



проникновения в клетки-мишени вирусная РНК обратно транскрибируется, проникает в ядро и стабильно интегрируется в геном хозяина. Через один или два дня после интеграции вирусной РНК может быть обнаружена экспрессия рекомбинантного белка, например, антигенного рецептора, такого как CAR.

[0233] В некоторых вариантах осуществления предложенные способы включают способы трансдукции клеток путем создания контакта, например, инкубации, клеточной композиции, содержащей множество клеток, с вирусными частицами. В некоторых вариантах осуществления клетки, которые будут трансфицированы или трансдуцированы, представляют собой или включают первичные клетки, полученные от субъекта, такие как клетки, обогащенные и/или отобранные из клеток субъекта.

[0234] В некоторых вариантах осуществления концентрация трансдуцируемых клеток композиции составляет от или от примерно  $1,0 \times 10^5$  клеток/мл до  $1,0 \times 10^8$  клеток/мл, например, по меньшей мере или по меньшей мере примерно, или примерно  $1,0 \times 10^5$  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.

[0235] В некоторых вариантах осуществления вирусные частицы предоставляют при определенном соотношении числа копий вирусных векторных частиц, или их инфекционных единиц (ИЕ), и общего количества трансдуцируемых клеток (ИЕ/клетку). Например, в некоторых вариантах осуществления вирусные частицы присутствуют во время контактирования в количестве или по меньшей мере, или примерно 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50 или 60 ИЕ вирусных векторных частиц на одну клетку.

[0236] В некоторых вариантах осуществления титр вирусных векторных частиц составляет от или от примерно  $1 \times 10^6$  ИЕ/мл до  $1 \times 10^8$  ИЕ/мл, например, от или от примерно  $5 \times 10^6$  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.

[0237] В некоторых вариантах осуществления трансдукцию можно проводить при множественности инфекции (МОИ) менее 100, например, как правило, менее 60, 50, 40, 30, 20, 10, 5 или менее.

[0238] В некоторых вариантах осуществления способ включает создание контакта или инкубирование клеток с вирусными частицами. В некоторых вариантах осуществления контакт продолжается в течение периода времени 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, в течение по меньшей мере или по меньшей мере примерно 30 минут, 1 часа, 2 часов, 6 часов, 12 часов, 24 часов, 36 часов или более.

[0239] В некоторых вариантах осуществления контакт происходит в растворе. В некоторых вариантах осуществления клетки и вирусные частицы контактируют в объеме, составляющем от или от примерно 0,5 мл до 500 мл, например, от или от примерно 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.

[0240] В конкретных вариантах осуществления исходные клетки обрабатывают, инкубируют или приводят в контакт с частицами, которые содержат связывающие молекулы, связывающие или узнающие рекомбинантный рецептор, закодированный вирусной ДНК.

[0241] В некоторых вариантах осуществления инкубация клеток с вирусными векторными частицами приводит к получению произведенной композиции, содержащей клетки, трансдуцированные вирусными векторными частицами.

## **2. Не вирусные векторы**

[0242] В некоторых вариантах осуществления рекомбинантные нуклеиновые кислоты переносят в Т-клетки методом электропорации (смотри, 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 методом транспозиции (смотри, 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 методы 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 микрочастицами вольфрама (Johnston, Nature, 346: 776-777 (1990)); и совместное осаждение ДНК с фосфатом стронция (Brash et al., Mol. Cell Biol., 7: 2031-2034 (1987)).

[0243] Другие подходы и векторы для переноса нуклеиновых кислот, кодирующих рекомбинантные продукты, описаны, например, в публикации международной патентной заявки № WO2014055668 и патенте США № 7446190.

[0244] В некоторых вариантах осуществления клетки, например, Т-клетки, могут быть трансфицированы либо в процессе, либо после размножения, например, Т-клеточным рецептором (TCR) или химерным антигенным рецептором (CAR). Эту трансфекцию для введения гена желаемого рецептора можно выполнять, например, с использованием любого подходящего ретровирусного вектора. Затем популяцию генетически модифицированных клеток можно освободить от начального стимула (стимула CD3/CD28, например), с последующей стимуляцией стимулом второго типа, например, через *de novo* введенный рецептор). Этот стимул второго типа может включать антигенный стимул в форме молекулы пептид/МНС, когнатного (перекрестно связывающегося) лиганда генетически введенного рецептора (например, естественного лиганда CAR) или любого лиганда (такого как антитело), который непосредственно связывается в пределах каркаса нового рецептора (например, за счет узнавания константных областей в рецепторе). Смотри, например, Cheadle et al., «Chimeric antigen

receptors for T-cell based therapy» *Methods Mol Biol.* 2012; 907:645-66 или Barrett et al., *Chimeric Antigen Receptor Therapy for Cancer Annual Review of Medicine Vol. 65: 333-347* (2014).

[0245] В некоторых случаях можно использовать вектор, который не нуждается в том, чтобы клетки, например, Т-клетки, были активированными. В некоторых таких случаях клетки могут быть отобраны и/или трансдуцированы до активации. Таким образом, клетки могут быть генетически модифицированы до или после культивирования клеток, и в некоторых случаях одновременно или в течение по меньшей мере части процесса культивирования.

[0246] В некоторых аспектах клетки дополнительно генетически модифицируют для стимуляции экспрессии цитокинов или других факторов. В число дополнительных нуклеиновых кислот, например, генов для введения, входят те, которые повышают эффективность терапии, например, за счет стимуляции жизнеспособности и/или функции клеток, в которые их переносят; гены маркера для селекции и/или оценки клеток, например, для оценки выживания или локализации *in vivo*; гены для повышения безопасности, например, позволяющие проводить отрицательную селекцию клеток *in vivo*, как описано в публикациях Lupton S. D. et al., *Mol. and Cell Biol.*, 11:6 (1991); и Riddell et al., *Human Gene Therapy* 3:319-338 (1992); смотри также публикации PCT/US91/08442 и PCT/US94/05601 авторов Lupton et al., в которых описано применение бифункциональных селективных слитых генов, полученных в результате слияния доминантно положительного селективного маркера с отрицательным селективным маркером. Смотри, например, Riddell et al., патент США № 6040177 в колонках 14-17.

[0247] В некоторых вариантах осуществления рекомбинантные нуклеиновые кислоты переносят в Т-клетки при помощи транспозонов. Транспозоны (мобильные генетические элементы) представляют собой мобильные сегменты ДНК, которые могут перемещаться из одного локуса в другой в пределах геномов. Эти элементы перемещаются по консервативному механизму «вырезание-и-вставка»: транспозаза катализирует вырезание транспозона из его исходного участка локализации и стимулирует его повторную интеграцию в другой участок генома. В случае дефицита транспозазы элементы могут перемещаться, если транспозаза предоставлена за счет другого гена транспозазы. Таким образом, транспозоны могут быть использованы для встраивания чужеродной ДНК в геном хозяина без использования системы вирусной трансдукции. Примеры транспозонов, подходящих для использования в клетках млекопитающих, например, человеческих первичных лейкоцитах, включают, но не ограничиваются ими, транспозоны «спящая красавица» и Piggybac.

[0248] Система трансфекции на основе транспозонов представляет собой двухкомпонентную систему, состоящую из транспозазы и транспозона. В некоторых вариантах осуществления система включает транспозон, генетически модифицированный для содержания чужеродной ДНК (в настоящем документе также называемой ДНК-грузом), например, гена, кодирующего рекомбинантный рецептор, фланкированной

последовательностями инвертированного повтора/прямого повтора (IR/DR), которые узнает сопровождающая транспозаза. В некоторых вариантах осуществления невирусная плазида кодирует транспозазу под контролем промотора. Трансфекция плазмиды в клетку-хозяина приводит к временной экспрессии транспозазы, таким образом, в начальный период времени после трансфекции транспозаза экспрессируется на достаточных уровнях, чтобы произошла интеграция транспозона в геномную ДНК. В некоторых вариантах осуществления сама транспозаза не интегрируется в геномную ДНК и, вследствие этого, экспрессия транспозазы снижается с течением времени. В некоторых вариантах осуществления транспозаза экспрессируется в клетке-хозяине на уровнях, достаточных для интегрирования соответствующего транспозона, в течение менее примерно 4 часов, менее примерно 8 часов, менее примерно 12 часов, менее примерно 24 часов, менее примерно 2 дней, менее примерно 3 дней, менее примерно 4 дней, менее примерно 5 дней, менее примерно 6 дней, менее примерно 7 дней, менее примерно 2 недель, менее примерно 3 недель, менее примерно 4 недель, менее примерно 5 недель или менее примерно 8 недель. В некоторых вариантах осуществления ДНК-груз, введенная в геном хозяина, впоследствии не удаляется из генома хозяина, по меньшей мере вследствие того, что хозяин не экспрессирует эндогенную транспозазу, способную вырезать ДНК-груз.

[0249] «Спящая красавица» (SB) является синтетическим представителем суперсемейства транспозонов Tc/1-mariner, реконструированных из бездействующих элементов, скрытых в геноме лососевых рыб. Система трансфекции на основе транспозона SB представляет собой двухкомпонентную систему, состоящую из транспозазы и транспозона, содержащего последовательности инвертированного повтора/прямого повтора (IR/DR), что приводит к точной интеграции в динуклеотид ТА. Транспозон спроектирован с экспрессионной интересующей кассетой, фланкированной IR/DR. Транспозаза SB связывает специфические сайты связывания, расположенные на IR транспозона «спящая красавица». Транспозаза SB опосредует интеграцию транспозона, мобильного генетического элемента, кодирующего последовательность «груза», фланкированную с обеих сторон инвертированными концевыми повторами, содержащими сайты связывания для каталитического фермента (SB). Стабильная экспрессия имеет место, когда SB встраивает генные последовательности в хромосомы позвоночных в динуклеотид-мишень ТА по механизму вырезание-и-вставка. Эта система была использована для генетической модификации различных типов клеток позвоночных, включая первичные человеческие лейкоциты периферической крови. В некоторых вариантах осуществления клетки приводят в контакт, инкубируют и/или обрабатывают транспозоном SB, содержащим ген-груз, например, ген, кодирующий рекомбинантный рецептор или CAR, фланкированный последовательностями IR SB. В конкретных вариантах осуществления трансфицируемые клетки приводят в контакт, инкубируют и/или обрабатывают плазмидой, содержащей транспозон SB, содержащий ген-груз, например, ген, кодирующий CAR, фланкированный последовательностями IR SB. В

конкретных вариантах осуществления плазида также содержит ген, кодирующий транспозазу SB, который не фланкирован последовательностями IR SB.

[0250] PiggyBac (PB) представляет собой другую систему транспозона, которую можно использовать для интеграции ДНК-груза в геном хозяина, например, человеческую геномную ДНК. Транспозаза PB узнает специфические для транспозона PB последовательности инвертированных концевых повторов (ITR), расположенные на обоих концах транспозона, эффективно перемещает содержимое из исходных сайтов и эффективно интегрирует их в хромосомные сайты TТАА. Система транспозона PB позволяет переносить интересующие гены между двумя ITR в векторе PB в геном-мишени. Система PB была использована для генетической модификации различных типов клеток позвоночных, включая первичные человеческие клетки. В некоторых вариантах осуществления трансфицируемые клетки приводят в контакт, инкубируют и/или обрабатывают транспозоном PB, содержащим ген-груз, например, ген, кодирующий CAR, фланкированный последовательностями IR PB. В конкретных вариантах осуществления трансфицируемые клетки приводят в контакт, инкубируют и/или обрабатывают плазмидой, содержащей транспозон PB, содержащий ген-груз, например, ген, кодирующий CAR, фланкированный последовательностями IR PB. В конкретных вариантах осуществления плазида также содержит ген, кодирующий транспозазу PB, который не фланкирован последовательностями IR PB.

[0251] В некоторых вариантах осуществления различные элементы транспозона/транспозазы используют в конкретных способах, например, вектор(ы) SB или PB могут быть получены стандартными методами расщепления ферментами рестрикции, лигирования и молекулярного клонирования. Один из протоколов для конструирования конкретных векторов включает следующие этапы. Во-первых, очищенные фрагменты нуклеиновой кислоты, содержащие нуклеотидные последовательности нужных компонентов, а также посторонние последовательности, вырезают эндонуклеазами рестрикции из исходных источников, например, вектора, содержащего ген транспозазы. Фрагменты, содержащие нужные нуклеотидные последовательности, затем отделяют от ненужных фрагментов другого размера общепринятыми методами разделения, например, методом электрофореза в агарозном геле. Нужные фрагменты вырезают из геля и лигируют вместе в соответствующей конфигурации, с получением кольцевой нуклеиновой кислоты, или плазмиды, содержащей нужные последовательности, например, последовательности, соответствующие различным элементам конкретных векторов, описанных выше. При необходимости, сконструированные таким образом кольцевые молекулы затем размножают в прокариотическом хозяине, например, *E. coli*. Методы расщепления, конструирования плазмиды, трансформации клеток и продуцирования плазмиды, используемые в данных этапах, хорошо известны специалистам в данной области, и ферменты, необходимые для рестрикции и лигирования, коммерчески доступны. (Смотри, 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. Примеры конструирования векторов, используемых в конкретных способах, приведены в экспериментальном разделе, ниже. Получение репрезентативной системы транспозона «спящая красавица» также описано в WO 98/40510 и WO 99/25817).

[0252] В некоторых вариантах осуществления трансдукцию при помощи транспозонов проводят с плазмидой, содержащей ген транспозазы, и плазмидой, содержащей транспозон, который содержит последовательность ДНК-груза, фланкированную последовательностями инвертированного повтора/прямого повтора (IR/DR), узнаваемыми транспозазой. В конкретных вариантах осуществления последовательность ДНК-груза кодирует гетерологичный белок, например, рекомбинантный T-клеточный рецептор или CAR. В некоторых вариантах осуществления плазида содержит транспозазу и транспозон. В некоторых вариантах осуществления ген транспозазы находится под контролем убиквитарного промотора, или любого промотора, подходящего для управления экспрессией транспозазы в клетке-мишени. Убиквитарные промоторы включают, но без ограничения, промоторы EF1a, CMV, SV40, PGK1, Ubc, человеческого  $\beta$ -актина, CAG, TRE, UAS, Ac5, CaMKIIa и U6. В некоторых вариантах осуществления ДНК-груз содержит селективную кассету, позволяющую проводить селекцию клеток со стабильно интегрированной ДНК-грузом в геномной ДНК. Подходящие селективные кассеты включают, но без ограничения, 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.

[0253] В некоторых вариантах осуществления компоненты для трансдукции при помощи транспозона, например, плазмиды, содержащие транспозазу SB и транспозон SB, вводят в клетку-мишень. Можно использовать любой удобный протокол, способный обеспечивать *in vitro* или *in vivo* введение компонентов системы в клетку-мишень, в зависимости от расположения клетки-мишени. Например, если клетка-мишень представляет собой выделенную клетку, систему можно вводить непосредственно в клетку в условиях культивирования клеток, поддерживающих жизнеспособность клетки-мишени, например, с использованием стандартных методов трансформации. Такие методы включают, но не обязательно ограничиваются ими: вирусную инфекцию, трансформацию, конъюгацию, слияние протопластов, электропорацию, технологию бомбардировки частицами, осаждение фосфатом кальция, прямую микроинъекцию, доставку вирусным вектором и тому подобное. Выбор метода, как правило, зависит от типа трансформируемой клетки и обстоятельств, в которых происходит трансформация (то есть *in vitro*, *ex vivo* или *in vivo*). Общее описание этих методов можно найти в Ausubel, et al., Short Protocols in Molecular Biology, 3-е издание, Wiley & Sons, 1995.

[0254] В некоторых вариантах осуществления источники транспозона SB и транспозазы SB вводят в клетку-мишень многоклеточного организма, например, млекопитающего или человека, в условиях, допускающих вырезание фланкированной инвертированными повторами нуклеиновой кислоты из вектора, несущего транспозон, и последующую интеграцию вырезанной нуклеиновой кислоты в геном клетки-мишени. Некоторые варианты осуществления также включают этап подтверждения того, что необходимая активность транспозазы имеется в клетке-мишени наряду с введенным транспозоном. В зависимости от структуры самого вектора с транспозоном, то есть, того, содержит ли вектор область, кодирующую продукт, имеющий активность транспозазы, способ может дополнительно включать введение второго вектора в клетку-мишень, который кодирует необходимую активную транспозазу.

[0255] В некоторых вариантах осуществления количество векторной нуклеиновой кислоты, содержащей транспозон, и количество векторной нуклеиновой кислоты, кодирующей транспозазу, которое вводят в клетку, достаточно для обеспечения желаемого вырезания и встраивания нуклеиновой кислоты транспозона в геном клетки-мишени. По этой причине, введенное количество векторной нуклеиновой кислоты должно обеспечивать достаточное количество активности транспозазы и достаточное число копий нуклеиновой кислоты, которое желательно вводить в клетку-мишень. Количество векторной нуклеиновой кислоты, которое вводят в клетку-мишень, варьируется в зависимости от эффективности конкретного используемого протокола введения, например, конкретного используемого протокола введения *ex vivo*.

[0256] После проникновения векторной ДНК в клетку-мишень в сочетании с необходимой транспозазой область векторной нуклеиновой кислоты, которая фланкирована инвертированными повторами, то есть, векторной нуклеиновой кислоты, расположенной между узнаваемыми транспозазой «спящая красавица» инвертированными повторами, вырезается из вектора за счет предоставленной транспозазы и встраивается в геном клетки-мишени. Таким образом, за введением векторной ДНК в клетку-мишень следует опосредованное транспозазой вырезание и встраивание экзогенной нуклеиновой кислоты, находящейся в векторе, в геном клетки-мишени. В конкретных вариантах осуществления вектор интегрируется в геном 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 трансфицированы транспозоном SB и/или транспозазой SB. В некоторых вариантах осуществления интеграция нуклеиновой кислоты в геном клетки-мишени является стабильной, то есть, векторная нуклеиновая кислота остается в геноме клетки-мишени на протяжении более, чем короткого периода времени и передается в виде части хромосомного генетического материала потомству клетки-мишени.

[0257] В конкретных вариантах осуществления транспозоны используют для интеграции нуклеиновых кислот, то есть, полинуклеотидов, разных размеров в геном

клетки-мишени. В некоторых вариантах осуществления размер ДНК, встраиваемой в геном клетки-мишени с использованием конкретных способов, находится в диапазоне от примерно 0,1 т.п.н. до 200 т.п.н., от примерно 0,5 т.п.н. до 100 т.п.н., от примерно 1,0 т.п.н. до примерно 8,0 т.п.н., от примерно 1,0 до примерно 200 т.п.н., от примерно 1,0 до примерно 10 т.п.н., от примерно 10 т.п.н. до примерно 50 т.п.н., от примерно 50 т.п.н. до примерно 100 т.п.н. или от примерно 100 т.п.н. до примерно 200 т.п.н. В некоторых вариантах осуществления размер ДНК, встраиваемой в геном клетки-мишени с использованием конкретных способов, находится в диапазоне от примерно от примерно 1,0 т.п.н. до примерно 8,0 т.п.н. В некоторых вариантах осуществления размер ДНК, встраиваемой в геном клетки-мишени с использованием конкретных способов, находится в диапазоне от примерно 1,0 до примерно 200 т.п.н. В конкретных вариантах осуществления размер ДНК, встраиваемой в геном клетки-мишени с использованием конкретных способов, находится в диапазоне от примерно 1,0 т.п.н. до примерно 8,0 т.п.н.

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

[0258] В некоторых вариантах осуществления предложенные способы включают один или более этапов культивирования клеток, например, культивирования клеток в условиях, стимулирующих пролиферацию и/или размножение. В некоторых вариантах осуществления клетки культивируют в условиях, стимулирующих пролиферацию и/или размножение, после этапа генетической модификации, например, введения рекомбинантного полипептида в клетки путем трансдукции или трансфекции. В конкретных вариантах осуществления клетки культивируют после того, как клетки были инкубированы в стимулирующих условиях и трансдуцированы или трансфицированы рекомбинантным полинуклеотидом, например, полинуклеотидом, кодирующим рекомбинантный рецептор.

[0259] В конкретных вариантах осуществления одна или более композиций генетически модифицированных Т-клеток представляют собой или включают две отдельные композиции обогащенных Т-клеток. В конкретных вариантах осуществления две отдельные композиции обогащенных Т-клеток, например, две отдельные композиции обогащенных Т-клеток, отобранных, выделенных и/или обогащенных из одного и того же биологического образца, культивируют в стимулирующих условиях отдельно. В конкретных вариантах осуществления две отдельные композиции включают композицию обогащенных CD4<sup>+</sup> Т-клеток. В конкретных вариантах осуществления две отдельные композиции включают композицию обогащенных CD8<sup>+</sup> Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления две отдельные композиции обогащенных CD4<sup>+</sup> Т-клеток и обогащенных CD8<sup>+</sup> Т-клеток культивируют отдельно, например, в условиях, стимулирующих пролиферацию и/или размножение. В некоторых вариантах осуществления культивируют одну композицию обогащенных Т-клеток. В конкретных вариантах осуществления одна композиция представляет собой композицию обогащенных CD4<sup>+</sup> Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления одна композиция представляет собой композицию обогащенных CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-клеток, которые были объединены из отдельных



композиций до культивирования.

[0260] В некоторых вариантах осуществления композиция обогащенных CD4+ Т-клеток, которые культивируют, например, в условиях, стимулирующих пролиферацию и/или размножение, содержит 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 примерно 100% CD4+ Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления композиция 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 примерно 100% CD4+ Т-клеток, которые экспрессируют рекомбинантный рецептор и/или были трансдуцированы или трансфицированы рекомбинантным полинуклеотидом. В конкретных вариантах осуществления композиция обогащенных CD4+ Т-клеток, которые культивируют, содержит менее 40%, менее 35%, менее 30%, менее 25%, менее 20%, менее 15%, менее 10%, менее 5%, менее 1%, менее 0,1% или менее 0,01% CD8+ Т-клеток, и/или не содержит CD8+ Т-клетки, и/или свободна, или практически свободна, от CD8+ Т-клеток.

[0261] В некоторых вариантах осуществления композиция обогащенных CD8+ Т-клеток, которые культивируют, например, в условиях, стимулирующих пролиферацию и/или размножение, содержит 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 примерно 100% CD8+ Т-клеток. В конкретных вариантах осуществления композиция 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 примерно 100% CD8+ Т-клеток, которые экспрессируют рекомбинантный рецептор и/или были трансдуцированы или трансфицированы рекомбинантным полинуклеотидом. В конкретных вариантах осуществления композиция обогащенных CD8+ Т-клеток, которые инкубируют в стимулирующих условиях, содержит менее 40%, менее 35%, менее 30%, менее 25%, менее 20%, менее 15%, менее 10%, менее 5%, менее 1%, менее 0,1% или менее 0,01% CD4+ Т-клеток, и/или не содержит CD4+ Т-клетки, и/или свободна, или практически свободна, от CD4+ Т-клеток.

[0262] В некоторых вариантах осуществления отдельные композиции обогащенных CD4+ и CD8+ Т-клеток объединяют в одну композицию и культивируют, например, в условиях, стимулирующих пролиферацию и/или размножение. В конкретных вариантах осуществления отдельные культивируемые композиции обогащенных CD4+ и обогащенных CD8+ Т-клеток объединяют в одну композицию после проведения и/или

завершения культивирования.

[0263] В некоторых вариантах осуществления композицию обогащенных Т-клеток культивируют в условиях, стимулирующих пролиферацию и/или размножение. В некоторых вариантах осуществления такие условия могут быть предназначены для индукции пролиферации, размножения, активации и/или выживания клеток в популяции. В конкретных вариантах осуществления стимулирующие условия могут включать одно или более из конкретной среды, температуры, содержания кислорода, содержания диоксида углерода, периода времени, средств, например, питательных веществ, аминокислот, антибиотиков, ионов и/или стимулирующих факторов, таких как цитокины, хемокины, антигены, связывающие партнеры, слитые белки, рекомбинантные растворимые рецепторы, а также любые другие средства, предназначенные для стимуляции роста, деления и/или размножения клеток.

[0264] В конкретных вариантах осуществления клетки культивируют в присутствии одного или более цитокинов. В конкретных вариантах осуществления один или более цитокинов представляют собой рекомбинантные цитокины. В некоторых вариантах осуществления один или более цитокинов представляют собой человеческие рекомбинантные цитокины. В конкретных вариантах осуществления один или более цитокинов связывают, и/или способны связывать, рецепторы, экспрессируемые Т-клетками и/или эндогенные для Т-клеток. В конкретных вариантах осуществления один или более цитокинов представляют собой или включают представителя семейства цитокинов с пучком 4-альфа-спиралей. В некоторых вариантах осуществления представители семейства цитокинов с пучком 4-альфа-спиралей включают, но без ограничения, 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 (G-CSF) и гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (GM-CSF).

[0265] В конкретных вариантах осуществления клетки не инкубируют, не приводят в контакт и/или не подвергают воздействию средства, ингибирующего активность mTOR, например, средства, описанного в настоящем документе, например, в разделе II, до культивирования, например, культивирования в условиях, стимулирующих пролиферацию и/или размножение.

[0266] В конкретных вариантах осуществления по меньшей мере часть культивирования проводят в присутствии средства, ингибирующего активность mTOR, такого как средство, описанное в настоящем документе, например, в разделе II. В некоторых вариантах осуществления культивирование целиком и/или полностью проводят в присутствии средства, ингибирующего активность mTOR.

[0267] В конкретных вариантах осуществления клетки культивируют в присутствии средства, ингибирующего активность mTOR. В конкретных вариантах осуществления средство, ингибирующее активность mTOR, представляет собой средство, описанное в настоящем документе, например, в разделе II. В некоторых вариантах

осуществления средство, ингибирующее активность mTOR, также ингибирует активность дополнительной киназы. В конкретных вариантах осуществления средство, ингибирующее активность mTOR, также ингибирует активность фосфоинозитол-3-киназы (PI3K). В конкретных вариантах осуществления средство избирательно ингибирует активность mTOR, например, заметно не ингибирует активность PI3K, и/или не ингибирует активность PI3K в такой же степени, как активность mTOR, при концентрациях, достаточных для ингибирования активности mTOR. В некоторых вариантах осуществления средство, ингибирующее активность mTOR, ингибирует активность киназы. В конкретных вариантах осуществления средство, ингибирующее активность mTOR, ингибирует активность mTORC1 и/или mTORC2. В некоторых вариантах осуществления средство, ингибирующее активность mTOR, ингибирует активность киназы mTORC1 и mTORC2.

[0268] В некоторых вариантах осуществления клетки культивируют со средствами, выбранными из PI103, SF1126, BGT226, XL765, PF-04691502, NVP-BEZ235, пиразолопиримидина, торина 1, торкиниба (PP242), PP30, Ku-0063794, WAY-600 (Wyeth), WAY-687 (Wyeth), WAY-354 (Wyeth), AZD8055, рапамицина (сиролимус), темсиролимуса (CC1779), эверолимуса (RAD001), дефоролимуса (AP23573), AZD8055 (AstraZeneca) и OSI-027 (OSI). В некоторых вариантах осуществления средство, ингибирующее активность mTOR, имеет или включает формулу, приведенную в разделе II, например, формулу (I), формулу (II) или формулу (III). В некоторых вариантах осуществления средство представляет собой соединение 155, соединение 246 или соединение 63.

[0269] В конкретных вариантах осуществления клетки культивируют в присутствии средства, ингибирующего активность mTOR, в концентрации, которая приводит к ингибированию, уменьшению и/или снижению активности mTOR. В некоторых вариантах осуществления концентрация приводит к ингибированию, уменьшению и/или снижению одной или более активностей mTOR на примерно или по меньшей мере 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99% или 99,9%. В некоторых вариантах осуществления концентрация средства не предотвращает пролиферацию и/или размножение первичных Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления клетки культивируют в присутствии средства, ингибирующего активность mTOR, в концентрации от 1 нМ до 1 мкМ, от 1 нМ до 100 нМ, от 50 нМ до 250 нМ, от 100 нМ до 250 нМ, от 200 нМ до 500 нМ, от 50 нМ до 250 нМ, от 100 нМ до 500 нМ, от 500 нМ до 1 мкМ, от 1 мкМ до 10 мкМ или от 5 мкМ до 50 мкМ. В конкретных вариантах осуществления клетки культивируют в присутствии средства, ингибирующего активность mTOR, в концентрации примерно или по меньшей мере 0,1 нМ, 0,5 нМ, 1 нМ, 5 нМ, 10 нМ, 25 нМ, 50 нМ, 100 нМ, 150 нМ, 200 нМ, 250 нМ, 500 нМ, 1 мкМ, 5 мкМ, 10 мкМ, 25 мкМ, 50 мкМ или 100 мкМ.

[0270] В некоторых вариантах осуществления клетки инкубируют в присутствии соединения 155. В конкретных вариантах осуществления клетки инкубируют в присутствии соединения 155 в концентрации от 1 нМ до 1 мкМ, от 1 нМ до 100 нМ, от 50

нМ до 200 нМ, от 100 нМ до 250 нМ или от 200 нМ до 500 нМ. В конкретных вариантах осуществления клетки инкубируют в присутствии соединения 155 в концентрации примерно или по меньшей мере 10 нМ, 25 нМ, 50 нМ, 100 нМ, 150 нМ, 200 нМ, 250 нМ или 500 нМ.

[0271] В конкретных вариантах осуществления клетки инкубируют в присутствии соединения 246. В конкретных вариантах осуществления клетки инкубируют в присутствии соединения 246 в концентрации от 1 нМ до 1 мкМ, от 1 нМ до 100 нМ, от 50 нМ до 200 нМ, от 100 нМ до 250 нМ или от 200 нМ до 500 нМ. В конкретных вариантах осуществления клетки инкубируют в присутствии соединения 246 в концентрации примерно или по меньшей мере 10 нМ, 25 нМ, 50 нМ, 100 нМ, 150 нМ, 200 нМ, 250 нМ или 500 нМ.

[0272] В конкретных вариантах осуществления клетки инкубируют в присутствии соединения 63. В конкретных вариантах осуществления клетки инкубируют в присутствии соединения 63 в концентрации от 1 нМ до 1 мкМ, от 1 нМ до 100 нМ, от 50 нМ до 200 нМ, от 100 нМ до 250 нМ или от 200 нМ до 500 нМ. В некоторых вариантах осуществления клетки инкубируют в присутствии соединения 63 в концентрации примерно или по меньшей мере 10 нМ, 25 нМ, 50 нМ, 100 нМ, 150 нМ, 200 нМ, 250 нМ или 500 нМ.

[0273] В некоторых вариантах осуществления культивирование проводят в условиях, которые, как правило, включают температуру, подходящую для роста первичных иммунных клеток, таких как человеческие Т-лимфоциты, например, по меньшей мере примерно 25 градусов Цельсия, как правило, по меньшей мере примерно 30 градусов, и как правило, или примерно, 37 градусов Цельсия. В некоторых вариантах осуществления композицию обогащенных Т-клеток инкубируют при температуре 25-38°C, например, 30-37°C, например, при или при примерно 37°C ± 2°C. В некоторых вариантах осуществления инкубацию проводят до того момента, когда культивирование, например, культивирование или размножение, приводит к достижению желаемой, или пороговой, плотности, количеству или дозе клеток. В некоторых вариантах осуществления инкубация продолжается в течение более или более примерно 24 часов, 48 часов, 72 часов, 96 часов, 5 дней, 6 дней, 7 дней, 8 дней, 9 дней или более.

[0274] В конкретных вариантах осуществления культивирование проводят в закрытой системе. В конкретных вариантах осуществления культивирование проводят в закрытой системе в стерильных условиях. В конкретных вариантах осуществления культивирование проводят в той же закрытой системе, что и один или более этапов предложенных способов. В некоторых вариантах осуществления композицию обогащенных Т-клеток извлекают из закрытой системы и помещают в, и/или соединяют с биореактором для культивирования. Примеры подходящих биореакторов для культивирования включают, но без ограничения, GE Xuri W25, GE Xuri W5, Sartorius BioSTAT RM 20 | 50, Finesse SmartRocker Bioreactor Systems и Pall XRS Bioreactor Systems. В некоторых вариантах осуществления биореактор используют для перфузии и/или

перемешивания клеток в течение по меньшей мере части этапа культивирования.

[0275] В некоторых вариантах осуществления перемешивание представляет собой или включает качание и/или движение. В некоторых случаях биореактор можно двигать или раскачивать, что, в некоторых аспектах, может увеличивать перенос кислорода. Движение биореактора может включать, но не ограничивается ими, вращение по горизонтальной оси, вращение по вертикальной оси, качательное движение по наклонной или расположенной под углом горизонтальной оси биореактора, или любое их сочетание. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере часть инкубации проводят при качании. Скорость качания и угол качания можно регулировать для достижения желаемого 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 конкретных 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.

[0276] В некоторых вариантах осуществления в биореакторе поддерживают температуру на уровне точно, или примерно, 37°C и CO<sub>2</sub> на уровнях точно, или примерно, 5% с постоянным воздушным потоком со скоростью точно, или примерно, 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 более 2,0 л/мин. В конкретных вариантах осуществления по меньшей мере часть этапа культивирования проводят с перфузией, со скоростью 290 мл/сутки, 580 мл/сутки и/или 1160 мл/сутки, например, в зависимости от времени с начала культивирования и/или плотности культивируемых клеток. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере часть этапа размножения клеточной культуры проводят при качании, например, под углом от 5° до 10°, например, 6°, с постоянной скоростью качания, например, со скоростью от 5 до 15 об/мин, например, 6 об/мин или 10 об/мин.

#### **Е. Формулирование клеток**

[0277] В некоторых вариантах осуществления предложенные способы производства, создания или продуцирования предназначенных для клеточной терапии и/или генетически модифицированных клеток могут включать формулирование клеток, например, формулирование генетически модифицированных клеток, полученных в предложенных этапах обработки, до или после инкубации, генетической модификации и культивирования, и/или одного или более других описанных этапов обработки. В некоторых вариантах осуществления предложенные способы, относящиеся к формулированию клеток, включают обработку трансдуцированных клеток, например, клеток, трансдуцированных и/или размноженных с использованием этапов обработки,

описанных выше, в закрытой системе. В некоторых вариантах осуществления доза клеток, содержащих клетки, генетически модифицированные рекомбинантным антигенным рецептором, например, CAR или TCR, предложена в виде композиции или препарата, например, фармацевтической композиции или препарата. Такие композиции можно использовать в сочетании с предложенными способами, например, для предотвращения или лечения заболеваний, состояний и нарушений, или в качестве обнаруживающих, диагностических и прогностических способов.

[0278] В некоторых случаях обработка клеток в одном или более этапах (например, проводимых в центрифужной камере и/или закрытой системе) производства, создания или продуцирования предназначенных для клеточной терапии и/или генетически модифицированных клеток может включать формулирование клеток, например, формулирование генетически модифицированных клеток, полученных в предложенных этапах обработки путем трансдукции, до или после культивирования, например, культивирования и размножения, и/или одного или более других описанных этапов размножения. В некоторых случаях клетки могут быть сформулированы в количестве для введения дозы, например, для введения одной дозы или введения нескольких доз. В некоторых вариантах осуществления предложенные способы, относящиеся к формулированию клеток, включают обработку трансдуцированных клеток, например, клеток, трансдуцированных и/или размноженных с использованием этапов обработки, описанных выше, в закрытой системе.

[0279] В конкретных вариантах осуществления одну или более композиций обогащенных Т-клеток формулируют. В конкретных вариантах осуществления одну или более композиций обогащенных Т-клеток формулируют после генетической модификации и/или культивирования одной или более композиций. В конкретных вариантах осуществления одна или более композиций представляют собой исходные композиции. В некоторых вариантах осуществления одна или более исходных композиций ранее были криоконсервированы и сохранены, и разморожены перед инкубацией.

[0280] В некоторых вариантах осуществления Т-клетки, такие как CD4<sup>+</sup> и/или CD8<sup>+</sup> Т-клетки, полученные в одном или более этапах обработки, формулируют. В некоторых аспектах отдельно производят, получают или создают множество композиций, каждая из которых содержит разные популяции и/или подтипы клеток от субъекта, например, для отдельного или независимого введения, необязательно, в течение определенного периода времени. Например, отдельные препараты генетически модифицированных клеток, содержащие разные популяции или подтипы клеток, могут включать CD8<sup>+</sup> и CD4<sup>+</sup> Т-клетки, соответственно, и/или обогащенные по CD8<sup>+</sup> и CD4<sup>+</sup> клеткам популяции, соответственно, например, CD4<sup>+</sup> и/или CD8<sup>+</sup> Т-клетки индивидуально включают клетки, генетически модифицированные для экспрессии рекомбинантного рецептора. В некоторых вариантах осуществления сформулирована по меньшей мере одна композиция, содержащая CD4<sup>+</sup> Т-клетки, генетически

модифицированные для экспрессии рекомбинантного рецептора. В некоторых вариантах осуществления сформулирована по меньшей мере одна композиция, содержащая CD8+ Т-клетки, генетически модифицированные для экспрессии рекомбинантного рецептора. В некоторых вариантах осуществления введение дозы включает введение первой композиции, содержащей дозу CD8+ Т-клеток или дозу CD4+ Т-клеток, и введение второй композиции, содержащей другую дозу CD4+ Т-клеток и CD8+ Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления первую композицию, содержащую дозу CD8+ Т-клеток или дозу CD4+ Т-клеток, вводят до введения второй композиции, содержащей другую дозу CD4+ Т-клеток и CD8+ Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления введение дозы включает введение композиции, содержащей как дозу CD8+ Т-клеток, так и дозу CD4+ Т-клеток.

[0281] В конкретных вариантах осуществления одна или более композиций обогащенных Т-клеток представляют собой или включают две отдельные композиции, например, отдельные генетически модифицированные и/или культивированные композиции, обогащенных Т-клеток. В конкретных вариантах осуществления две отдельные композиции обогащенных Т-клеток, например, две отдельные композиции обогащенных Т-клеток, отобранных, выделенных и/или обогащенных из одного и того же биологического образца, формулируют отдельно. В конкретных вариантах осуществления две отдельные композиции включают композицию обогащенных CD4+ Т-клеток. В конкретных вариантах осуществления две отдельные композиции включают композицию обогащенных CD8+ Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления две отдельные композиции обогащенных CD4+ Т-клеток и обогащенных CD8+ Т-клеток формулируют отдельно. В некоторых вариантах осуществления формулируют одну композицию обогащенных Т-клеток. В конкретных вариантах осуществления одна композиция представляет собой композицию обогащенных CD4+ Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления одна композиция представляет собой композицию обогащенных CD4+ и CD8+ Т-клеток, которые были объединены из отдельных композиций перед формулированием.

[0282] В некоторых вариантах осуществления отдельные композиции обогащенных CD4+ и CD8+ Т-клеток объединяют в одну композицию и формулируют. В конкретных вариантах осуществления отдельно сформулированные композиции обогащенных CD4+ и обогащенных CD8+ Т-клеток объединяют в одну композицию после проведения или завершения формулирования.

[0283] В некоторых вариантах осуществления сформулированная композиция обогащенных CD4+ Т-клеток содержит 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 примерно 100% CD4+ Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления композиция 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 примерно 100% CD4+ Т-клеток, которые экспрессируют рекомбинантный рецептор и/или были трансдуцированы или трансфицированы рекомбинантным полинуклеотидом. В конкретных вариантах осуществления сформулированная композиция обогащенных CD4+ Т-клеток содержит менее 40%, менее 35%, менее 30%, менее 25%, менее 20%, менее 15%, менее 10%, менее 5%, менее 1%, менее 0,1% или менее 0,01% CD8+ Т-клеток, и/или не содержит CD8+ Т-клетки, и/или свободна, или практически свободна, от CD8+ Т-клеток.

[0284] В некоторых вариантах осуществления сформулированная композиция обогащенных CD8+ Т-клеток, например, в условиях, стимулирующих пролиферацию и/или размножение, содержит 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 примерно 100% CD8+ Т-клеток. В конкретных вариантах осуществления композиция 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 примерно 100% CD8+ Т-клеток, которые экспрессируют рекомбинантный рецептор и/или были трансдуцированы или трансфицированы рекомбинантным полинуклеотидом. В конкретных вариантах осуществления сформулированная композиция обогащенных CD8+ Т-клеток, которую инкубируют в стимулирующих условиях, содержит менее 40%, менее 35%, менее 30%, менее 25%, менее 20%, менее 15%, менее 10%, менее 5%, менее 1%, менее 0,1% или менее 0,01% CD4+ Т-клеток, и/или не содержит CD4+ Т-клетки, и/или свободна, или практически свободна, от CD4+ Т-клеток.

[0285] В конкретных вариантах осуществления сформулированные клетки представляют собой произведенные клетки. В некоторых вариантах осуществления сформулированная композиция обогащенных Т-клеток представляет собой произведенную композицию обогащенных Т-клеток. В конкретных вариантах осуществления сформулированные CD4+ Т-клетки и/или сформулированные CD8+ Т-клетки представляют собой произведенные CD4+ и/или CD8+ Т-клетки. В конкретных вариантах осуществления сформулированная композиция обогащенных CD4+ Т-клеток представляет собой произведенную композицию обогащенных CD4+ Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления сформулированная композиция обогащенных CD8+ Т-клеток представляет собой произведенную композицию обогащенных CD8+ Т-клеток.

[0286] В некоторых вариантах осуществления клетки могут быть сформулированы в контейнере, таком как мешок или флакон.

[0287] В некоторых вариантах осуществления клетки формулируют в



фармацевтически приемлемом буфере, который в некоторых аспектах может включать фармацевтически приемлемый носитель или эксципиент. В некоторых вариантах осуществления обработка включает замену среды на среду или буфер для препарата, который является фармацевтически приемлемым или предназначенным для введения субъекту. В некоторых вариантах осуществления этапы обработки могут включать промывание трансдуцированных и/или размноженных клеток для перевода клеток в фармацевтически приемлемый буфер, который может содержать один или более необязательных фармацевтически приемлемых носителей или эксципиентов. Примерами таких фармацевтических форм, включая фармацевтически приемлемые носители или эксципиенты, могут быть любые из тех, которые описаны ниже в качестве форм, приемлемых для введения клеток и композиций субъекту. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит клетки в количествах, эффективных для лечения или предотвращения заболевания или состояния, например, в терапевтически эффективных или профилактически эффективных количествах.

[0288] «Фармацевтически приемлемый носитель» означает ингредиент в фармацевтическом препарате, отличный от активного ингредиента, который является нетоксичным для субъекта. Фармацевтически приемлемый носитель включает, но без ограничения, буфер, эксципиент, стабилизатор или консервант.

[0289] В некоторых аспектах выбор носителя частично определяется конкретной клеткой и/или способом введения. Соответственно, существуют различные подходящие препараты. Например, фармацевтическая композиция может содержать консерванты. Подходящие консерванты могут включать, например, метилпарабен, пропилпарабен, бензоат натрия и бензалкония хлорид. В некоторых аспектах используют смесь двух или более консервантов. Консерванты, или их смеси, как правило, присутствуют в количестве от примерно 0,0001% до примерно 2% по массе от общей массы композиции. Носители описаны, например, в сборнике Remington's Pharmaceutical Sciences 16-е издание, Osol, A. Ed. (1980). Фармацевтически приемлемые носители, как правило, являются нетоксичными для реципиентов в используемых дозах и концентрациях, и включают, но без ограничения, буферы, такие как фосфат, цитрат и другие органические кислоты; антиоксиданты, включая аскорбиновую кислоту и метионин; консерванты (такие как октадецилдиметилбензил аммония хлорид; гексаметэтония хлорид; бензалкония хлорид; бензэтония хлорид; фенол, бутил или бензиловый спирт; алкилпарабены, такие как метил- или пропилпарабен; катехол; резорцинол; циклогексанол; 3-пентанол и м-крезол); низкомолекулярные (менее примерно 10 остатков) полипептиды; белки, такие как сывороточный альбумин, желатин или иммуноглобулины; гидрофильные полимеры, такие как поливинилпирролидон; аминокислоты, такие как глицин, глутамин, аспарагин, гистидин, аргинин или лизин; моносахариды, дисахариды и другие углеводы, включая глюкозу, маннозу или декстрины; хелатирующие агенты, такие как ЭДТА; сахара, такие как сахароза, маннит, трегалоза или сорбит; солеобразующие противоионы, такие как натрий; комплексы металлов (например, комплексы Zn-белок) и/или неионные

сурфактанты, такие как полиэтиленгликоль (ПЭГ).

[0290] В некоторых аспектах в композиции включают буферные средства. Подходящие буферные средства включают, например, лимонную кислоту, цитрат натрия, фосфорную кислоту, фосфат калия, а также разные другие кислоты и соли. В некоторых аспектах используют смесь двух или более буферных средств. Буферные средства, или их смеси, как правило, присутствуют в количестве от примерно 0,001% до примерно 4% по массе от общей массы композиции. Способы получения вводимых фармацевтических композиций известны. Иллюстративные способы описаны более подробно, например, в сборнике Remington: Science and Practice of Pharmacy, Lippincott Williams & Wilkins; 21-е издание (1 мая 2005 г.).

[0291] Препараты могут включать водные растворы. Препарат или композиция также может содержать более одного активного ингредиента, полезного для предотвращения конкретного нарушения, заболевания или состояния с помощью клеток, в том числе, один или более активных ингредиентов, активности которых дополняют активность клеток, и/или соответствующие активности не оказывают взаимного негативного влияния. Такие активные ингредиенты предпочтительно присутствуют в сочетании в количествах, которые эффективны для намеченной цели. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция дополнительно содержит другие фармацевтически активные средства или лекарственные средства, такие как химиотерапевтические средства, например, аспарагиназа, бусульфан, карбоплатин, цисплатин, даунорубицин, доксорубицин, фторурацил, гемцитабин, гидроксимочевина, метотрексат, паклитаксел, ритуксимаб, винбластин и/или винкристин.

[0292] В некоторых вариантах осуществления предложены композиции в виде стерильных жидких препаратов, например, изотонических водных растворов, суспензий, эмульсий, дисперсий или вязких композиций, которые в некоторых аспектах могут быть забуферены до выбранного значения pH. Жидкие композиции могут содержать носители, которые могут представлять собой растворитель или дисперсионную среду, содержащие, например, воду, солевой раствор, фосфатно-солевой буфер, полиол (например, глицерин, пропиленгликоль, жидкий полиэтиленгликоль), а также их соответствующие смеси. Стерильные инъекционные растворы могут быть получены путем включения клеток в растворитель, например, в виде смеси с соответствующим носителем, разбавителем или эксципиентом, таким как стерильная вода, физиологический солевой раствор, глюкоза, декстроза или тому подобное. Композиции могут содержать вспомогательные вещества, такие как увлажняющие, диспергирующие или эмульгирующие средства (например, метилцеллюлоза), поддерживающие pH буферные средства, гелеобразующие или повышающие вязкость добавки, консерванты, ароматизаторы и/или красители, в зависимости от пути введения и желаемого препарата. В некоторых аспектах можно обращаться к стандартным руководствам для приготовления соответствующих препаратов.

[0293] Можно добавлять различные добавки, повышающие стабильность и

стерильность композиций, включая противомикробные консерванты, антиоксиданты, хелатирующие агенты и буферы. Предотвращение действия микроорганизмов можно обеспечивать за счет различных антибактериальных и противогрибковых средств, например, парабенов, хлорбутанола, фенола и сорбиновой кислоты. Пролонгированной абсорбции инъекционной фармацевтической формы можно добиваться за счет использования средств, замедляющих абсорбцию, например, моностеарата алюминия и желатина.

[0294] В некоторых вариантах осуществления буфер для препарата содержит криоконсервант. В некоторых вариантах осуществления клетки формулируют с раствором для криоконсервации, который содержит 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 другую подходящую для замораживания клеток среду. В некоторых вариантах осуществления раствор для криоконсервации представляет собой или содержит, например, по меньшей мере или примерно 7,5% ДМСО. В некоторых вариантах осуществления этапы обработки могут включать промывание трансдуцированных и/или размноженных клеток для перевода клеток в раствор для криоконсервации. В некоторых вариантах осуществления клетки замораживают, например, криоконсервируют или криосохраняют, в среде и/или растворе с конечной концентрацией ДМСО, составляющей, или составляющей примерно, 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%. В конкретных вариантах осуществления клетки замораживают, например, криоконсервируют или криосохраняют, в среде и/или растворе с конечной концентрацией ЧСА, составляющей, или составляющей примерно, 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%.

[0295] В некоторых вариантах осуществления формулирование проводят с использованием одного или более этапов обработки, включая промывание, разбавление или концентрирование клеток, например, культивированных или размноженных клеток. В некоторых вариантах осуществления обработка может включать разбавление или концентрирование клеток до желаемой концентрации или количества, например, для композиций в стандартной дозе, содержащих количество клеток для введения конкретной дозы или ее части. В некоторых вариантах осуществления этапы обработки могут включать уменьшение объема для желаемого увеличения концентрации клеток. В некоторых вариантах осуществления этапы обработки могут включать увеличение объема для желаемого уменьшения концентрации клеток. В некоторых вариантах осуществления обработка включает добавление некоторого объема буфера для препарата к трансдуцированным и/или размноженным клеткам. В некоторых вариантах осуществления объем буфера для препарата составляет от или от примерно 10 мл до 1000

мл, например, по меньшей мере или примерно, или по меньшей мере примерно 50 мл, 100 мл, 200 мл, 300 мл, 400 мл, 500 мл, 600 мл, 700 мл, 800 мл, 900 мл или 1000 мл.

[0296] В некоторых вариантах осуществления такие этапы обработки для формулирования клеточной композиции проводят в закрытой системе. Например, такие этапы обработки можно проводить с использованием центрифужной камеры в сочетании с одной или более системами или наборами, связанными с системой обработки клеток, например, центрифужной камеры, изготовляемой и поставляемой компанией Biosafe SA, включая камеры, предназначенные для использования с системами обработки клеток Serax<sup>®</sup> или Serax 2<sup>®</sup>. Иллюстративная система и способ описаны в публикации международной патентной заявки с номером WO2016/073602. В некоторых вариантах осуществления способ включает выведение из внутренней полости центрифужной камеры сформулированной композиции, которая представляет собой полученную композицию клеток, сформулированную в буфере для препарата, таком как фармацевтически приемлемый буфер в любом из описанных выше вариантов осуществления. В некоторых вариантах осуществления сформулированную композицию выводят в контейнер, такой как флакон емкости из биомедицинского материала, описанный в настоящем документе, который функционально связан, как часть закрытой системы, с центрифужной камерой. В некоторых вариантах осуществления емкости из биомедицинского материала сконфигурированы для интеграции и/или функциональной связи, и/или интегрированы или функционально связаны, с закрытой системой или устройством, выполняющим один или более этапов обработки. В некоторых вариантах осуществления емкость из биомедицинского материала связана с системой на выходной линии или выходной позиции. В некоторых случаях закрытая система связана с флаконом емкости из биомедицинского материала на входной трубке. Иллюстративные закрытые системы для использования с емкостями из биомедицинского материала, описанными в настоящем документе, включают системы Serax<sup>®</sup> и Serax<sup>®</sup> 2.

[0297] В некоторых вариантах осуществления закрытая система, такая как связанная с центрифужной камерой или обработкой клеток система, включает многопортовый выходной комплект, содержащий многоходовой трубопроводный коллектор, связанный на каждом конце насосно-компрессорной трубы с портом, к которому может быть подключен один или более контейнеров для выведения сформулированной композиции. В некоторых аспектах нужное количество, или множество, флаконов можно стерильно соединять с одним или более, как правило, двумя или более, например, по меньшей мере 3, 4, 5, 6, 7, 8, или более, портами многопортового выхода. Например, в некоторых вариантах осуществления один или более контейнеров, например, емкостей из биомедицинского материала, можно соединять с портами, или не со всеми портами. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления система может осуществлять выведение произведенной композиции во множество флаконов емкостей из биомедицинского материала.

[0298] В некоторых аспектах клетки могут быть выведены в один или более из

множества контейнеров для готовой продукции, например, флаконов, в количестве для введения дозы, например, для введения одной дозы или введения нескольких доз. Например, в некоторых вариантах осуществления каждый из флаконов может содержать нужное количество клеток для введения конкретной дозы или ее части. Таким образом, в некоторых аспектах каждый флакон может содержать одну стандартную дозу для введения или может содержать часть нужной дозы, так что более чем один из множества флаконов, например два флакона или 3 флакона, вместе составляют дозу для введения.

[0299] Таким образом, контейнеры, например, мешки или флаконы, как правило, содержат клетки для введения, например, одной или более стандартных доз клеток. Стандартная доза может представлять собой количество или число клеток для введения субъекту, или двойное количество (или более) клеток для введения. Она может представлять собой самую низкую дозу или самую низкую возможную дозу клеток, вводимых субъекту.

[0300] В некоторых вариантах осуществления каждый из контейнеров, например, мешков или флаконов, индивидуально содержит стандартную дозу клеток. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления все контейнеры содержат одинаковые или примерно, или практически, одинаковые количества клеток. В некоторых вариантах осуществления каждая стандартная доза содержит по меньшей мере, или по меньшей мере примерно  $1 \times 10^6$ ,  $2 \times 10^6$ ,  $5 \times 10^6$ ,  $1 \times 10^7$ ,  $5 \times 10^7$  или  $1 \times 10^8$  генетически модифицированных клеток, суммарных клеток, Т-клеток или МКПК. В некоторых вариантах осуществления объем сформулированной клеточной композиции в каждом контейнере, например, мешке или флаконе, составляет от 10 мл до 100 мл, например, по меньшей мере, или по меньшей мере примерно 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, можно криоконсервировать. В некоторых вариантах осуществления контейнеры, например, флаконы, можно хранить в жидком азоте до дальнейшего использования.

[0301] В некоторых вариантах осуществления такие клетки, полученные способом, или композицию, содержащую такие клетки, вводят субъекту для лечения заболевания или состояния.

#### **Ф. Иллюстративные признаки произведенной композиции**

[0302] В конкретных вариантах осуществления предложенные способы используют в связи со способом получения или создания одной или более произведенных композиций обогащенных Т-клеток из одной или более исходных композиций и/или из одного биологического образца. В конкретных вариантах осуществления одна или более произведенных композиций содержат клетки, экспрессирующие рекомбинантный рецептор, например, TCR или CAR. В некоторых вариантах осуществления способ включает инкубацию, генетическую модификацию и/или культивирование клеток в присутствии средства, ингибирующего активность mTOR, такого как любое из описанных средств, например, соединение 63. В конкретных вариантах осуществления клетки произведенных композиций подходят для введения субъекту в качестве терапии,

например, аутологичной клеточной терапии.

[0303] В некоторых вариантах осуществления клетки произведенной композиции генетически модифицируют для экспрессии рекомбинантного рецептора способами, предложенными в настоящем документе, как описано выше. В конкретных вариантах осуществления клетки произведенной композиции генетически модифицируют для экспрессии химерного антигенного рецептора (CAR), например, анти-CD19 CAR.

[0304] В некоторых вариантах осуществления одна или более произведенных композиций представляют собой композицию обогащенных CD4+ и CD8+ Т-клеток. В конкретных вариантах осуществления одна или более произведенных композиций включают композицию обогащенных CD4+ Т-клеток. В конкретных вариантах осуществления одна или более произведенных композиций включают композицию обогащенных CD8+ Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления одна или более произведенных композиций включают произведенную композицию обогащенных CD4+ Т-клеток и произведенную композицию обогащенных CD8+ Т-клеток.

[0305] В некоторых вариантах осуществления произведенная композиция обогащенных CD4+ Т-клеток содержит 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 примерно 100% CD4+ Т-клеток. В конкретных вариантах осуществления произведенная композиция 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 примерно 100% CD4+ Т-клеток, которые экспрессируют рекомбинантный рецептор и/или были трансдуцированы или трансфицированы рекомбинантным полинуклеотидом. В конкретных вариантах осуществления произведенная композиция обогащенных CD4+ Т-клеток содержит менее 40%, менее 35%, менее 30%, менее 25%, менее 20%, менее 15%, менее 10%, менее 5%, менее 1%, менее 0,1% или менее 0,01% CD8+ Т-клеток, и/или не содержит CD8+ Т-клетки, и/или свободна, или практически свободна, от CD8+ Т-клеток.

[0306] В некоторых вариантах осуществления произведенная композиция обогащенных CD8+ Т-клеток содержит 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 примерно 100% CD8+ Т-клеток. В конкретных вариантах осуществления композиция 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 примерно 100% CD8+ Т-клеток, которые экспрессируют

рекомбинантный рецептор и/или были трансдуцированы или трансфицированы рекомбинантным полинуклеотидом. В конкретных вариантах осуществления произведенная композиция обогащенных CD8<sup>+</sup> Т-клеток содержит менее 40%, менее 35%, менее 30%, менее 25%, менее 20%, менее 15%, менее 10%, менее 5%, менее 1%, менее 0,1% или менее 0,01% CD4<sup>+</sup> Т-клеток, и/или не содержит CD4<sup>+</sup> Т-клетки, и/или свободна, или практически свободна, от CD4<sup>+</sup> Т-клеток.

[0307] В конкретных вариантах осуществления способ, связанный с предложенными способами, сравнивают с иллюстративным и/или альтернативным способом. В некоторых вариантах осуществления альтернативный и/или иллюстративный способ является аналогичным или таким же, как способ, связанный с предложенными способами, за исключением того, что композиции клеток (например, исходные клетки, стимулированные клетки, и/или генетически модифицированные клетки, которые включают обогащенные CD4<sup>+</sup> Т-клетки, обогащенные CD8<sup>+</sup> Т-клетки и/или обогащенные CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-клетки) не инкубируют, генетически не модифицируют и/или не культивируют в присутствии ингибитора mTOR, например, соединения 63. В некоторых вариантах осуществления произведенные клетки, полученные иллюстративным альтернативным способом, ранее не были культивированы, например, для размножения генетически модифицированных Т-клеток, в присутствии средства, ингибирующего активность mTOR, например, соединения 63. В некоторых вариантах осуществления произведенные клетки, полученные иллюстративным альтернативным способом, генетически модифицируют для экспрессии того же рекомбинантного рецептора, что и клетки произведенной композиции, полученные предложенными способами.

[0308] В некоторых вариантах осуществления один или более генов дифференциально экспрессируются клетками произведенной композиции в сравнении с экспрессией в произведенных клетках, полученных иллюстративным альтернативным способом, например, способом, в котором клетки не культивируют в присутствии ингибитора mTOR, например, соединения 63. В некоторых вариантах осуществления экспрессия одного или более генов снижена в клетках произведенной композиции в сравнении с произведенными клетками, полученными иллюстративным альтернативным способом. В некоторых вариантах осуществления экспрессия одного или более генов, связанных с метаболическим ответом на стресс, Т-клеточной активацией, путями активации Th1 и Th2, остановкой клеточного цикла, биосинтезом глюкокортикоидов, гемопоэзом из плюрипотентных стволовых клеток, Т-клеточной активацией, дифференциацией лимфоцитов, миграцией лейкоцитов, ингибиторной активностью цистеиновой эндопептидазы, прогрессированием клеточного цикла, ответом на уровни питательных веществ и передачей сигнала через рецептор фактора роста, снижена в клетках из произведенной композиции в сравнении с произведенными клетками, полученными иллюстративным альтернативным способом.

[0309] В конкретных вариантах осуществления экспрессия одного или более генов повышена в клетках произведенной композиции в сравнении с произведенными клетками,

полученными иллюстративным альтернативным способом, таким как способ, применяемый в отсутствие средства, ингибирующего mTOR, например, соединения 63. В некоторых вариантах осуществления экспрессия одного или более генов, связанных с передачей сигнала через рецептор фактора роста, окислением жирных кислот, сигнальным путем общего гамма-рецептора цитокинов, дегликозилированием белков, Т-клеточной активацией, прогрессированием клеточного цикла, дифференциацией лимфоцитов, путями активации Th1 и Th2, гомеостазом стерола, гемопоэзом из плюрипотентных стволовых клеток, процессом апоптоза, Т-клеточной активацией и активацией RAR, а также опосредованной ионами передачей сигнала, повышена в клетках из произведенной композиции в сравнении с произведенными клетками, полученными иллюстративным альтернативным способом.

[0310] В некоторых вариантах осуществления произведенная композиция содержит клетки, например, CD4<sup>+</sup> и/или CD8<sup>+</sup> Т-клетки, генетически модифицированные для экспрессии рекомбинантного рецептора, которые характеризуются таким же или более сильным ответом на стимуляцию антигеном, например, антигеном, который связывает и/или узнает рекомбинантный рецептор, в сравнении с произведенными клетками, полученными иллюстративным альтернативным способом, например, способом, в котором клетки не культивируют в присутствии ингибитора mTOR, например, соединения 63. В некоторых вариантах осуществления клетки произведенной композиции имеют такое же или большее, и/или способны иметь такое же или большее, увеличение гликолитического метаболизма, активности mTOR, продуцирования цитокинов, цитолитической активности, размножения и/или пролиферации в ответ на стимуляцию антигеном в сравнении с произведенными клетками, полученными иллюстративным альтернативным способом.

[0311] В некоторых вариантах осуществления произведенные клетки имеют аналогичный ответ с точки зрения параметров, характеристик и/или активности в сравнении с произведенными клетками, полученными иллюстративным/альтернативным способом (например, способом, в котором клетки не инкубируют, генетически не модифицируют и/или не культивируют в присутствии ингибитора mTOR, например, соединения 63). В некоторых вариантах осуществления показатель аналогичного ответа произведенных клеток статистически достоверно не отличается от показателя ответа произведенных клеток, полученных иллюстративным альтернативным способом. В некоторых вариантах осуществления показатель аналогичного ответа произведенных клеток находится в пределах 25%, 20%, 10%, 5% или 1% от показателя ответа произведенных клеток, полученных иллюстративным альтернативным способом.

[0312] В конкретных вариантах осуществления изменения клеточного метаболизма, например, скорости гликолитического метаболизма, могут действовать в качестве движущей силы и/или регулятора функции иммунных клеток. В некоторых вариантах осуществления клетки произведенной композиции имеют аналогичное увеличение скорости гликолитического метаболизма при стимуляции антигеном в



сравнении с произведенными клетками, полученными иллюстративным альтернативным способом (например, способом, в котором клетки не культивируют в присутствии ингибитора mTOR, например, соединения 63). В некоторых вариантах осуществления клетки произведенной композиции имеют, имеют примерно или имеют по меньшей мере 10%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 90%, 100%, 125%, 150%, 1-кратное, 2-кратное, 3-кратное, 4-кратное или 5-кратное увеличение скорости гликолитического метаболизма в ответ на стимуляцию антигеном. В конкретных вариантах осуществления увеличение гликолитического метаболизма в ответ на стимуляцию антигеном по меньшей мере на 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 50% или 100% превосходит увеличение скорости гликолитического метаболизма при стимуляции антигеном в произведенных клетках, полученных иллюстративным альтернативным способом. В конкретных вариантах осуществления гликолитический метаболизм можно измерять известными методами, в том числе, путем измерения поглощения кислорода и продуцирования кислоты во внеклеточном пространстве (ECAR).

[0313] В конкретных вариантах осуществления клетки произведенной композиции имеют аналогичное увеличение активности mTOR при стимуляции антигеном в сравнении с произведенными клетками, полученными иллюстративным альтернативным способом (например, способом, в котором клетки не культивируют в присутствии ингибитора mTOR, например, соединения 63). В некоторых вариантах осуществления клетки произведенной композиции имеют, имеют примерно или имеют по меньшей мере 25%, 50%, 75%, 100%, 125%, 150%, 1-кратное, 2-кратное, 3-кратное, 4-кратное или 5-кратное увеличение активности mTOR в ответ на стимуляцию антигеном. В конкретных вариантах осуществления увеличение активности mTOR в ответ на стимуляцию антигеном по меньшей мере на 25%, 50%, 75%, или 100% превосходит увеличение активности mTOR в ответ на стимуляцию антигеном в произведенных клетках, полученных иллюстративным альтернативным способом.

[0314] В конкретных вариантах осуществления клетки произведенной композиции имеют аналогичное продуцирование цитокинов в ответ на стимуляцию антигеном в сравнении с произведенными клетками, полученными иллюстративным альтернативным способом (например, способом, в котором клетки не культивируют в присутствии ингибитора mTOR, например, соединения 63). В некоторых вариантах осуществления клетки произведенной композиции имеют аналогичное продуцирование цитокина, например, TNF-альфа, IFN-гамма и/или IL-2, в ответ на стимуляцию антигеном в сравнении с произведенными клетками, полученными иллюстративным альтернативным способом. В некоторых вариантах осуществления клетки произведенной композиции имеют, имеют примерно или имеют по меньшей мере 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 90%, 100%, 125%, 150%, 1-кратное, 2-кратное, 3-кратное, 4-кратное или 5-кратное увеличение продуцирования одного или более цитокинов в ответ на стимуляцию антигеном в сравнении с альтернативным способом, применяемым в отсутствие средства, ингибирующего mTOR, например, соединения 63. В конкретных вариантах

осуществления увеличение продуцирования цитокинов в ответ на стимуляцию антигеном по меньшей мере на 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 50% или 100% превосходит увеличение продуцирования одного или более цитокинов после стимуляции антигеном в произведенных клетках, полученных иллюстративным альтернативным способом. В некоторых вариантах осуществления продуцирование цитокинов можно измерять или оценивать известными стандартными методами, включая, но без ограничения, ELISA и/или методы обнаружения на основе антител.

[0315] В конкретных вариантах осуществления клетки произведенной композиции имеют аналогичную часть, процентную долю и/или количество клеток, которые продуцируют один или более цитокинов в ответ на стимуляцию антигеном, в сравнении с частью, процентной долей и/или количеством произведенных клеток, полученных иллюстративным альтернативным способом (например, способом, в котором клетки не культивируют в присутствии ингибитора mTOR, например, соединения 63). В конкретных вариантах осуществления примерно или по меньшей мере 10%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 90%, 95% или 100% клеток произведенной композиции продуцируют один или более цитокинов, например, TNF-альфа, IFN-гамма и/или IL-2, в ответ на стимуляцию антигеном. В конкретных вариантах осуществления часть, процентная доля и/или количество клеток произведенной композиции, которые продуцируют один или более цитокинов, примерно или по меньшей мере на 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 75%, 100%, 125%, 150% или в 1 раз, 2 раза, 3 раза, превышает часть, процентную долю и/или количество произведенных клеток, полученных иллюстративным альтернативным способом, которые продуцируют один или более цитокинов. В конкретных вариантах осуществления часть, процентная доля и/или количество клеток, которые продуцируют цитокины, можно измерять или оценивать известным или стандартным методом, включая анализы внутриклеточного окрашивания цитокинов (ICS).

[0316] В конкретных вариантах осуществления клетки произведенной композиции имеют аналогичную цитолитическую активность в отношении клеток, экспрессирующих антиген, который связывает и/или узнает рекомбинантный рецептор (например, клеток-мишеней), в сравнении с произведенными клетками, полученными иллюстративным альтернативным способом (например, способом, в котором клетки не инкубируют, генетически не модифицируют и/или не культивируют в присутствии ингибитора mTOR, например, соединения 63). В некоторых вариантах осуществления, когда клетки произведенной композиции объединяют с клетками, экспрессирующими антиген, например, клетками-мишенями, клетки произведенной композиции уничтожают, уничтожают примерно или уничтожают по меньшей мере 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 100% клеток, экспрессирующих антиген. В конкретных вариантах осуществления клетки произведенной композиции уничтожают на по меньшей мере 25%, 50%, 75%, 100%, 150%, или в 1 раз, 2 раза, 3 раза, 4 раза или 5 раз больше клеток, экспрессирующих антиген, например, клеток-мишеней, чем

произведенные клетки, полученные иллюстративным альтернативным способом, в аналогичных или одинаковых условиях.

[0317] В конкретных вариантах осуществления клетки произведенной композиции имеют более низкую, уменьшенную и/или сокращенную часть, процентную долю и/или количество клеток, экспрессирующих один или более маркеров истощения, в сравнении с частью, процентной долей и/или количеством произведенных клеток, полученных иллюстративным альтернативным способом (например, способом, в котором клетки не культивируют в присутствии ингибитора mTOR, например, соединения 63). В конкретных вариантах осуществления менее чем, или примерно, 40%, 35%, 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, 5%, 1% или 0,1% клеток произведенной композиции экспрессируют один или более маркеров истощения. В конкретных вариантах осуществления часть, процентная доля и/или количество клеток, экспрессирующих один или более маркеров истощения, в произведенной композиции меньше по меньшей мере на 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% или 90%, чем часть, процентная доля и/или количество клеток, экспрессирующих один или более маркеров, в произведенной композиции, полученной иллюстративным альтернативным способом. В конкретных вариантах осуществления один или более маркеров истощения представляют собой или включают CTLA-4, FOXP3, PD-1, TIGIT, LAB-3, 2B4, VTLA, TIM3, VISTA и/или CD96.

[0318] В различных вариантах осуществления клетки произведенной композиции имеют более низкую, уменьшенную и/или сокращенную часть, процентную долю и/или количество дифференцированных клеток, в сравнении с частью, процентной долей и/или количеством произведенных клеток, полученных иллюстративным альтернативным способом (например, способом, в котором клетки не культивируют в присутствии ингибитора mTOR, например, соединения 63). В конкретных вариантах осуществления клетки произведенной композиции являются менее дифференцированными, чем клетки, полученные альтернативными способами. В конкретных вариантах осуществления менее дифференцированные клетки произведенной композиции имеют или проявляют большую способность к стимуляции, активации, размножению, цитокиновому ответу, цитолитической активности или противоопухолевой активности, чем более дифференцированные клетки, полученные иллюстративным альтернативным способом.

[0319] В некоторых вариантах осуществления предложенные способы приводят к получению произведенной композиции клеток, содержащей большее количество или процентную долю подобных клеткам памяти Т-клеток, например, популяции менее дифференцированных, долгоживущих Т-клеток, таких как долгоживущие Т-клетки памяти. В некоторых вариантах осуществления такие Т-клетки памяти представляют собой центральные Т-клетки памяти (T<sub>CM</sub>) или стволовые Т-клетки памяти (T<sub>SCM</sub>). В некоторых вариантах осуществления Т-клетки памяти представляют собой клетки T<sub>SCM</sub>. В некоторых вариантах осуществления клетки произведенной композиции имеют повышенное или большее количество, или процентную долю, клеток, имеющих фенотип, подобный фенотипу клеток памяти, таких как долгоживущие Т-клетки памяти. В

некоторых вариантах осуществления количество, или процентная доля, подобных клеткам памяти Т-клеток, таких как долгоживущие Т-клетки памяти или стволовые клетки памяти (T<sub>SCM</sub>), в композиции увеличено по меньшей мере 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 в сравнении с количеством или процентной долей соответствующей популяции произведенных клеток, полученных иллюстративным альтернативным способом (например, способом, в котором клетки не культивируют в присутствии ингибитора mTOR, например, соединения 63).

[0320] В конкретных вариантах осуществления клетки произведенной композиции вводят субъекту. В некоторых вариантах осуществления клетки произведенной композиции вводят для лечения заболевания или состояния. В некоторых вариантах осуществления заболевание или состояние представляет собой рак. В некоторых вариантах осуществления клетки произведенных композиций вводят субъекту, и у субъекта происходит уменьшение количества раковых клеток и/или объема опухоли. В некоторых вариантах осуществления у субъекта происходит уменьшение на, на примерно, или на по меньшей мере 25%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99%, 100% количества раковых клеток и/или объема опухоли после введения клеток произведенной композиции, например, в сравнении с количеством раковых клеток и/или объемом опухоли у субъекта до введения клеток. В некоторых вариантах осуществления введение клеток произведенной композиции приводит к повышенному уменьшению объема опухоли и/или количества раковых клеток у субъекта в сравнении с уменьшением объема опухоли и/или количества раковых клеток у субъекта после введения произведенных клеток, полученных иллюстративным альтернативным способом (например, способом, в котором клетки не культивируют в присутствии ингибитора mTOR, например, соединения 63). В конкретных вариантах осуществления введение клеток произведенной композиции приводит к увеличению уменьшения объема опухоли и/или количества раковых клеток у субъекта на примерно или на по меньшей мере 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 125%, 150%, в 1 раз, в 2 раза, 3 раза, 4 раза, 5 раз в сравнении с уменьшением объема опухоли и/или количества раковых клеток у субъекта после введения произведенных клеток, полученных иллюстративным альтернативным способом.

[0321] В конкретных вариантах осуществления клетки произведенных композиций, например, генетически модифицированные клетки, экспрессирующие рекомбинантный рецептор, могут быть обнаружены у субъекта, например, обнаружены в биологических образцах, таких как образцы сыворотки, полученные от субъекта, после введения. В конкретных вариантах осуществления клетки произведенной композиции могут быть обнаружены у субъектов через, или через по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8 недель после, или через, или через по меньшей мере 3, 6, 12, 18, 24, 30 или 36 месяцев, или через, или через по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5 или более лет после введения клеток произведенной композиции. В некоторых вариантах осуществления введение клеток произведенной композиции приводит к увеличенной или повышенной персистенции in

vivo после введения, в сравнении с произведенными клетками, полученными иллюстративным альтернативным способом (например, способом, в котором клетки не культивируют в присутствии ингибитора mTOR, например, соединения 63). В конкретных вариантах осуществления введенные клетки произведенной композиции могут быть обнаружены у субъекта дольше на, на примерно, или на по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8 недель, или на, на примерно, или на по меньшей мере 3, 6, 12, 18, 24, 30 или 36 месяцев, или на, на примерно, или на по меньшей мере 1, 2, 3 или более лет, чем произведенные клетки, полученные иллюстративным альтернативным способом.

[0322] В некоторых вариантах осуществления введение клеток произведенной композиции субъекту, например, субъекту, страдающему от заболевания или состояния, такого как рак, увеличивает возможность и/или вероятность выживания. Например, в некоторых вариантах осуществления, когда клетки произведенной композиции вводят субъекту, страдающему от заболевания или состояния, возможность и/или вероятность выживания в течение, в течение примерно, или в течение по меньшей мере 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12 месяцев, или в течение 1, 2, 3, 4, 5, 10, или более 10 лет составляет по меньшей мере 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или 100%. В конкретных вариантах осуществления введение клеток произведенной композиции обеспечивает большую по меньшей мере на 10%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 125%, 150%, или по меньшей мере в 1 раз, 2 раза, 3 раза, 4 раза или 5 раз возможность и/или вероятность выживания, чем введение произведенных клеток, полученных иллюстративным альтернативным способом (например, способом, в котором клетки не инкубируют, генетически не модифицируют и/или не культивируют в присутствии ингибитора mTOR, например, соединения 63).

## **II. Средства, ингибирующие активность mTOR**

[0323] В некоторых вариантах осуществления один или более этапов предложенных способов проводят в присутствии средства, ингибирующего активность mTOR. mTOR также известен как мишень рапамицина в клетках млекопитающих, механистическая мишень рапамицина, ассоциированный с комплексом FK506-связывающего белка 12-рапамицина белок 1, ассоциированный с комплексом FKBP12-рапамицин белок, мишень 1 рапамицина и FKBP12, белок-мишень 1 рапамицина, FRAP, FRAP1, FRAP2, RAFT1 и RAP1. В некоторых аспектах человеческий белок mTOR соответствует Uniprot № P42345. В некоторых вариантах осуществления аминокислотная последовательность человеческого белка mTOR приведена в SEQ ID NO: 34. В некоторых вариантах осуществления средство, ингибирующее активность mTOR, ингибирует, уменьшает и/или снижает, и/или способно ингибировать, уменьшать и/или снижать, по меньшей мере одну активность mTOR. В конкретных вариантах осуществления средство, ингибирующее активность mTOR, ингибирует, уменьшает и/или снижает, и/или способно ингибировать, уменьшать и/или снижать, активность киназы mTOR.

[0324] В некоторых аспектах mTOR представляет собой консервативную треонин/серин-специфическую протеинкиназу и относится к семейству киназ,

родственных фосфатидилинозитол-3-киназе (PI3K). mTOR представляет собой протеинкиназу, которая фосфорилирует остатки треонина и серина в ее субстратах. В конкретных аспектах mTOR служит в качестве каталитических субъединиц двух мультибелковых комплексов, называемых комплексом 1 mTOR (mTORC1) и комплексом 2 mTOR (mTORC2). В конкретных аспектах mTORC1 и mTORC2 функционируют независимо друг от друга, несмотря на тот факт, что в некоторых аспектах и mTORC1, и mTORC2, вовлечены в сигнальный путь фосфоинозитол-3-киназы (PI3K) и Akt. В некоторых вариантах осуществления средство, ингибирующее активность mTOR, ингибирует, уменьшает и/или снижает, и/или способно ингибировать, уменьшать и/или снижать, активность mTORC1, например, активность киназы mTORC1, и/или активность mTORC2.

[0325] В некоторых аспектах mTORC1 представляет собой белковый комплекс с пятью компонентами: mTOR, который представляет собой каталитическую субъединицу комплекса; связанный с регуляцией белок mTOR (Raptor); летальный с Sec13 белок 8 млекопитающих (mLST8, также известный как GβL); богатый пролином 40-кДа субстрат АКТ (PRAS40) и DEP-домен-содержащий mTOR-взаимодействующий белок (Deptor). В некоторых вариантах осуществления средство, ингибирующее активность mTOR, предотвращает образование и/или дестабилизирует комплекс mTORC1.

[0326] В некоторых аспектах mTORC2 содержит шесть разных белков, некоторые из которых являются общими для mTORC1 и mTORC2: mTOR; не чувствительный к рапамицину компаньон mTOR (Rictor); белок млекопитающих, взаимодействующий с активируемой стрессом протеинкиназой (mSIN1); белок, наблюдаемый с Rictor-1 (Protor-1); mLST8 и Deptor. В конкретных вариантах осуществления средство, ингибирующее активность, предотвращает образование и/или дестабилизирует комплекс mTORC2.

[0327] В некоторых вариантах осуществления средство, ингибирующее активность mTOR, представляет собой соединение, малую молекулу, например, малую органическую молекулу, полинуклеотид, олигонуклеотид, кРНК, полипептид, или их фрагмент, изоформу, вариант, аналог или производное, которое ингибирует, уменьшает, предотвращает, и/или способно ингибировать, уменьшать или предотвращать, одну или более активностей mTOR. В некоторых вариантах осуществления средство представляет собой малую молекулу. В конкретных вариантах осуществления средство представляет собой малую молекулу с молекулярной массой менее 10 кДа, менее 9 кДа, менее 8 кДа, менее 7 кДа, менее 6 кДа, менее 5 кДа, менее 4 кДа, менее 3 кДа, менее 2 кДа, менее 1 кДа, менее 0,5 кДа или менее 0,1 кДа. В некоторых вариантах осуществления средство представляет собой малую молекулу, которая представляет собой или содержит нуклеиновые кислоты, пептиды, полипептиды, пептидомиметики, пептоиды, углеводы, липиды, их компоненты, или другие органические или неорганические молекулы. Библиотеки химических и/или биологических смесей, таких как экстракты грибов, бактерий или водорослей, известны в данной области и могут быть подвергнуты скринингу в любом из анализов по изобретению. Примеры методов синтеза молекулярных

библиотек приведены в: (Carell et al., 1994a; Carell et al., 1994b; Cho et al., 1993; DeWitt et al., 1993; Gallop et al., 1994; Zuckermann et al., 1994).

[0328] В конкретных вариантах осуществления средство, ингибирующее активность mTOR, специфически и/или избирательно ингибирует по меньшей мере одну активность mTOR. В различных вариантах осуществления средство, ингибирующее активность mTOR, ингибирует по меньшей мере одну активность белка mTOR, такую как, например, активность серин/треонин-специфической протеинкиназы в отношении по меньшей мере одного из ее субстратов, например, p70S6 киназы 1, 4E-BP1, Akt и eEF2. В некоторых вариантах осуществления средство, ингибирующее активность mTOR, непосредственно связывает и ингибирует, и/или способно непосредственно связывать и ингибировать, mTORC1, mTORC2, или как mTORC1, так и mTORC2. В некоторых вариантах осуществления ингибирование активности mTOR средством является необратимым. В конкретных вариантах осуществления ингибирование активности mTOR средством является обратимым.

[0329] В конкретных вариантах осуществления средство, ингибирующее активность mTOR, имеет  $IC_{50}$  менее 500 мкМ, менее 200 мкМ, менее 100 мкМ, менее 50 мкМ, менее 10 мкМ, менее 5 мкМ, менее 1 мкМ, менее 500 нМ, менее 200 нМ, менее 100 нМ, менее 50 нМ, менее 10 нМ, менее 5 нМ, менее 1 нМ или менее 500 пМ. В конкретных вариантах осуществления средство, ингибирующее активность mTOR, имеет  $IC_{50}$  от 1 нМ до 500 мкМ, от 1 нМ до 500 нМ, от 1 мкМ до 500 мкМ, от 10 мкМ до 100 мкМ, от 100 нМ до 1 мкМ, от 250 нМ до 750 нМ, от 50 нМ до 200 нМ или от 400 нМ до 600 нМ. В некоторых вариантах осуществления  $IC_{50}$  можно определять любым известным стандартным и/или общепринятым методом. Например, в некоторых вариантах осуществления  $IC_{50}$  можно определять путем измерения активности mTOR в присутствии изучаемого ингибитора в диапазоне концентраций. Затем строят график зависимости экспериментально полученных значений ферментативной активности от используемых концентраций ингибитора. Концентрацию ингибитора, приводящую к 50% ферментативной активности (в сравнении с активностью в отсутствие какого-либо ингибитора) считают значением « $IC_{50}$ ». Аналогично, и другие ингибирующие концентрации можно определять путем соответствующего определения активности. В некоторых вариантах осуществления  $IC_{50}$  измеряют в бесклеточном анализе. В конкретных вариантах осуществления  $IC_{50}$  измеряют в анализе на культуре клеток. В конкретных вариантах осуществления культура клеток представляет собой культуру Т-клеток, например, культуру первичных Т-клеток.

[0330] В некоторых вариантах осуществления ингибирование активности mTORC1 и/или mTORC2 можно определять на основании уменьшения передачи сигнала на этапах пути после mTORC1 и/или mTORC2. Можно использовать самые разные показатели для определения уменьшения результата такого сигнального пути. Например, в некоторых вариантах осуществления неограничивающие иллюстративные показатели для активности mTORC2 включают (1) уменьшение фосфорилирования Akt на остатках, включая, но без

ограничения, S473 и T308, и/или (2) уменьшение активации Akt, о чем свидетельствует, например, уменьшение фосфорилирования субстратов Akt, включая, но без ограничения, Fox01 и Fox03a T24/32, GSK3-бета S21/9 и TSC2 T1462. В конкретных вариантах осуществления неограничивающие иллюстративные показатели для активности mTORC1 включают уменьшение фосфорилирования сигнальных молекул на этапах пути после mTORC1, включая, но без ограничения, рибосомный S6 S240/244, S6K1 T389 и 4EBP1 T37/46. В конкретных вариантах осуществления иллюстративным показателем ингибирования mTORC1 и/или mTORC2 является ингибирование пролиферации злокачественных клеток.

[0331] Измерение, обнаружение и/или оценку белков с сайт-специфическим фосфорилированием можно проводить любыми известными методами, включая, но без ограничения, методы окрашивания при помощи антител и иммуноанализы, твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA), иммуноферментный анализ (EIA), радиоиммунный анализ (RIA), поверхностный плазмонный резонанс (SPR), вестерн-блоттинг или белковые матрицы.

[0332] В некоторых вариантах осуществления средство, ингибирующее активность mTOR, также может ингибировать киназы, имеющие структурное сходство с mTOR, и/или имеющие активности, такие же или практически аналогичные активностям mTOR (пан-ингибитор). В конкретных вариантах осуществления средство, ингибирующее активность mTOR, также ингибирует активность фосфоинозитол-3-киназы (PI3K). В конкретных вариантах осуществления средство, ингибирующее активность mTOR, ингибирует активность mTORC1, активность mTORC2 и активность PI3K. В конкретных вариантах осуществления средство, ингибирующее активность mTOR, ингибирует активность киназы mTORC1, mTORC2 и PI3K. В конкретных аспектах можно использовать самые разные показатели для определения уменьшения активности PI3K. В некоторых вариантах осуществления такие показатели включают, но без ограничения, (1) уменьшение фосфорилирования Akt на остатках, включая, но без ограничения, S473 и T308, и/или (2) уменьшение активации Akt, о чем свидетельствует, например, уменьшение фосфорилирования субстратов Akt, включая, но без ограничения, Fox01 и Fox03a T24/32, GSK3-бета S21/9 и TSC2 T1462, и/или (3) уменьшение количества, уровня или концентрации фосфатидилинозитол-(3,4,5)-трифосфатов (PIP3).

[0333] В некоторых вариантах осуществления средство, ингибирующее активность mTOR, например, активность киназы mTORC1 и/или mTORC2, также ингибирует PI3K. В некоторых вариантах осуществления средство, ингибирующее активность mTOR, ингибирует активность PI3K, mTORC1 и mTORC2 с IC<sub>50</sub> (концентрация, ингибирующая 50% активности) менее 500 мкМ, менее 200 мкМ, менее 100 мкМ, менее 50 мкМ, менее 10 мкМ, менее 5 мкМ, менее 1 мкМ, менее 500 нМ, менее 200 нМ, менее 100 нМ, менее 50 нМ, менее 10 нМ, менее 5 нМ, менее 1 нМ или менее 500 пМ. В конкретных вариантах осуществления средство, ингибирующее активность mTOR, ингибирует активность PI3K, mTORC1 и mTORC2 с IC<sub>50</sub> от 1 нМ до 500 мкМ, от 1 нМ до 500 нМ, от 1 мкМ до 500 мкМ,



от 1 нМ до 1 мкМ, от 10 мкМ до 100 мкМ, от 100 нМ до 1 мкМ, от 250 нМ до 750 нМ, от 50 нМ до 200 нМ или от 400 нМ до 600 нМ. В некоторых вариантах осуществления  $IC_{50}$  измеряют в бесклеточном анализе. В конкретных вариантах осуществления  $IC_{50}$  измеряют в анализе на культуре клеток. В конкретных вариантах осуществления культура клеток представляет собой культуру Т-клеток, например, культуру первичных Т-клеток. В конкретных вариантах осуществления такие средства включают, но без ограничения, PI103, SF1126 (Semafore), BGT226 (Novartis), XL765 (Exelixis), PF-04691502 и NVP-BEZ235 (Novartis). В конкретных вариантах осуществления средство, ингибирующее активность mTOR, представляет собой PI103, SF1126, BGT226, XL765, PF-04691502 и NVP-BEZ235.

[0334] В некоторых вариантах осуществления средство, ингибирующее активность mTOR, не ингибирует активность PI3K. В конкретных вариантах осуществления средство заметно не уменьшает, не ингибирует или не снижает активность PI3K при  $IC_{50}$  для активности mTOR. В конкретных вариантах осуществления средство, ингибирующее активность mTOR, имеет величину  $IC_{50}$  для активности PI3K, которая на 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 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 50 раз или по меньшей мере в 100 раз больше, чем величина  $IC_{50}$  для активности mTOR. В некоторых вариантах осуществления средство, ингибирующее активность mTOR, ингибирует, например, избирательно ингибирует, активность киназы mTORC1 и mTORC2 в сравнении с активностью PI3K. В конкретных вариантах осуществления ингибитор активности mTOR представляет собой пиразолопиримидин, торин 1, торкиниб (PP242), PP30, Ku-0063794, WAY-600 (Wyeth), WAY-687 (Wyeth), WAY-354 (Wyeth) или AZD8055.

[0335] В конкретных вариантах осуществления средство, ингибирующее активность mTOR, избирательно ингибирует mTORC1 с  $IC_{50}$  менее 500 мкМ, менее 200 мкМ, менее 100 мкМ, менее 50 мкМ, менее 10 мкМ, менее 5 мкМ, менее 1 мкМ, менее 500 нМ, менее 200 нМ, менее 100 нМ, менее 50 нМ, менее 10 нМ, менее 5 нМ, менее 1 нМ или менее 500 пМ. В конкретных вариантах осуществления средство, ингибирующее активность mTOR, ингибирует активность mTORC1 с  $IC_{50}$  от 1 нМ до 500 мкМ, от 1 нМ до 500 нМ, от 1 мкМ до 500 мкМ, от 10 мкМ до 100 мкМ, от 100 нМ до 1 мкМ, от 250 нМ до 750 нМ, от 50 нМ до 200 нМ или от 400 нМ до 600 нМ. В некоторых вариантах осуществления  $IC_{50}$  измеряют в бесклеточном анализе. В конкретных вариантах осуществления  $IC_{50}$  измеряют в анализе на культуре клеток. В конкретных вариантах осуществления культура клеток представляет собой культуру Т-клеток, например, культуру первичных Т-клеток.

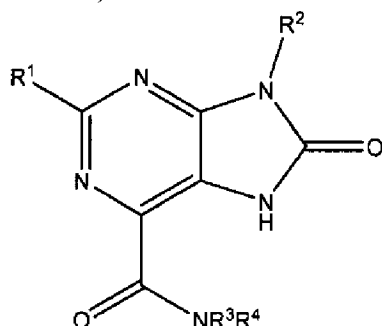
[0336] В некоторых вариантах осуществления средство, ингибирующее активность mTOR, избирательно ингибирует активность mTORC1 в сравнении с активностью

mTORC2 и/или PI3K. В конкретных вариантах осуществления средство, ингибирующее активность mTOR, имеет величину  $IC_{50}$  для активности PI3K, которая на 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 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 50 раз или по меньшей мере в 100 раз больше, чем величина  $IC_{50}$  для активности mTORC1. В некоторых вариантах осуществления средство представляет собой рапамицин (сиролимус). В конкретных вариантах осуществления средство представляет собой рапалог.

[0337] В конкретных вариантах осуществления рапалог связывает и/или способен связывать FRB домен mTOR (FKBP рапамицин-связывающий домен), имеет структурное родство с рапамицином и/или сохраняет mTORC1-ингибирующие свойства рапамицина. В некоторых вариантах осуществления рапалог представляет собой сложный эфир, эфир, оксим, гидразон и/или гидросиламин рапамицина, и/или представляет собой соединения, в которых функциональные группы на структуре ядра рапамицина были модифицированы, например, путем восстановления или окисления. Фармацевтически приемлемые соли таких соединений также считают производными рапамицина. Иллюстративные примеры рапалогов, подходящих для использования в способах, предложенных в настоящем документе, включают, без ограничения, темсиролимус (CC1779), эверолимус (RAD001), дефоролимус (AP23573), AZD8055 (AstraZeneca) и OSI-027 (OSI).

[0338] В некоторых вариантах осуществления средство представляет собой молекулу, описанную в РСТ публикациях №№ WO2008/051493; WO2008/051494 или WO2010/062571; и/или патентах США №: 7981893; 8372976; 7968556; 8383634; 8110578 или 8492381, все из которых включены в настоящий документ посредством ссылки.

[0339] В конкретных вариантах осуществления средство, ингибирующее активность mTOR, имеет или включает формулу, приведенную в Формуле (I):



Формула (I)

где  $R^1$  представляет собой замещенный или незамещенный  $C_{1-8}$  алкил, замещенный или незамещенный арил, замещенный или незамещенный гетероарил, замещенный или незамещенный циклоалкил, или замещенный или незамещенный гетероциклоалкил,

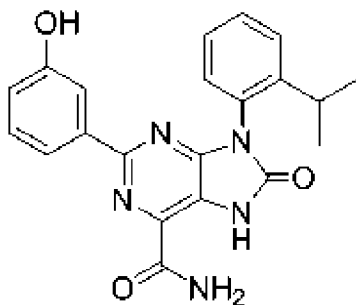
$R^2$  представляет собой замещенный или незамещенный  $C_{1-8}$  алкил, замещенный или

незамещенный арил, замещенный или незамещенный гетероарил, замещенный или незамещенный циклоалкил, или замещенный или незамещенный гетероциклоалкил, и

$R^3$  и  $R^4$  независимо представляют собой H или  $C_{1-8}$  алкил.

[0340] В некоторых вариантах осуществления средство, ингибирующее mTOR, представляет собой или содержит соединение формулы (I), или его фармацевтически приемлемую соль или сольват. В некоторых вариантах осуществления средство, ингибирующее mTOR представляет собой или содержит соединение формулы (I), где  $R^1$  представляет собой замещенный арил, замещенный или незамещенный гетероарил, такой как замещенный фенил. В конкретных вариантах осуществления средство, ингибирующее активность mTOR, представляет собой или содержит соединение формулы (I), где  $R^2$  представляет собой замещенный или незамещенный арил, такой как замещенный или незамещенный фенил. В конкретных вариантах осуществления средство, ингибирующее mTOR, представляет собой или содержит соединение формулы (I), где группы, которые являются замещенными, замещены одним или более из групп галогена;  $C_{1-8}$  алкила;  $C_{2-8}$  алкенила;  $C_{2-8}$  алкинила; гидроксила;  $C_{1-8}$  алкоксила; амино; нитро; тиола; тиоэфира; имида; циано; амидо; фосфонато; фосфина; карбоксила; тиокарбонила; сульфонила; сульфонида; кетона; альдегида; сложного эфира; карбонила; галоалкила;  $B(OH)_2$ ; карбоциклического циклоалкила, гетероциклоалкила, моноциклического или конденсированного, или не конденсированного полициклического арила или гетероарила; амино; O-нижнего алкила; O-арила, арила; арила-нижнего алкила;  $CO_2CH_3$ ;  $CONH_2$ ;  $OCH_2CONH_2$ ;  $NH_2$ ;  $SO_2NH_2$ ;  $OCHF_2$ ;  $CF_3$  или  $OCF_3$ , при этом каждая из этих групп, необязательно, является замещенной.

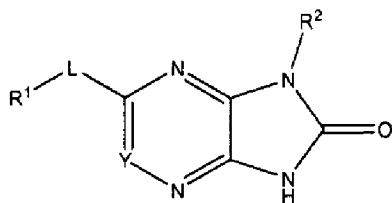
[0341] В некоторых вариантах осуществления средство, которое имеет или включает формулу, приведенную в Формуле (I), представляет собой соединение 63. В конкретных вариантах осуществления средство, ингибирующее активность mTOR, представляет собой соединение 63. В некоторых аспектах соединение 63 представляет собой 2-(3-гидроксифенил)-9-(2-изопропилфенил)-8-оксо-8,9-дигидро-7H-пурин-6-карбоксамид. В некоторых аспектах средство, ингибирующее активность mTOR, представляет собой 2-(3-гидроксифенил)-9-(2-изопропилфенил)-8-оксо-8,9-дигидро-7H-пурин-6-карбоксамид, или его фармацевтически приемлемую соль или сольват. В конкретных аспектах соединение 63 имеет формулу:



(Соединение 63).

[0342] В конкретных вариантах осуществления средство, ингибирующее

активность mTOR, имеет или включает формулу, приведенную в Формуле (II):



Формула (II)

где L представляет собой простую связь, NH или O,

Y представляет собой N или CR<sup>3</sup>,

при этом R<sup>1</sup> представляет собой H, замещенный или незамещенный C<sub>1-8</sub> алкил, замещенный или незамещенный C<sub>2-8</sub> алкенил, замещенный или незамещенный арил, замещенный или незамещенный гетероарил, замещенный или незамещенный циклоалкил, или замещенный или незамещенный гетероциклоалкил,

[0343] R<sup>2</sup> представляет собой H, замещенный или незамещенный C<sub>1-8</sub> алкил, замещенный или незамещенный арил, замещенный или незамещенный гетероарил, замещенный или незамещенный циклоалкил, или замещенный или незамещенный гетероциклоалкил,

[0344] R<sup>3</sup> представляет собой H, замещенный или незамещенный C<sub>1-8</sub> алкил, замещенный или незамещенный арил, замещенный или незамещенный гетероарил, замещенный или незамещенный циклоалкил, замещенный или незамещенный гетероциклоалкил, -NHR<sup>4</sup> или -N(R<sup>4</sup>)<sub>2</sub>, и

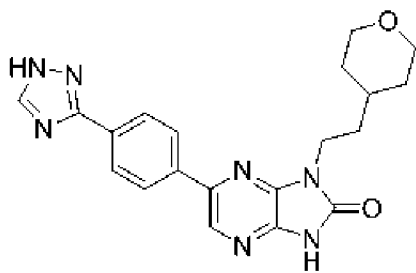
[0345] R<sup>4</sup> в каждом случае независимо представляет собой замещенный или незамещенный C<sub>1-8</sub> алкил, замещенный или незамещенный арил, замещенный или незамещенный гетероарил, замещенный или незамещенный циклоалкил, или замещенный или незамещенный гетероциклоалкил.

[0346] В некоторых вариантах осуществления средство, ингибирующее mTOR, представляет собой или содержит соединение формулы (II), или его фармацевтически приемлемую соль или сольват. В конкретных вариантах осуществления средство, ингибирующее активность mTOR, имеет или включает формулу, приведенную в Формуле (II), где R<sup>1</sup> представляет собой замещенный арил, такой как замещенный фенил. В конкретных вариантах осуществления средство, ингибирующее активность mTOR, имеет или включает формулу, приведенную в Формуле (II), где Y представляет собой CH. В некоторых вариантах осуществления средство, ингибирующее активность mTOR, имеет или включает формулу, приведенную в Формуле (II), где L представляет собой простую связь. В конкретных вариантах осуществления средство, ингибирующее активность mTOR, имеет или включает формулу, приведенную в Формуле (II), где R<sup>1</sup> представляет собой замещенный или незамещенный арил, и R<sup>2</sup> представляет собой C<sub>1-8</sub> алкил, замещенный одним или более заместителями, выбранными из алкокси, амино, гидроксид, циклоалкила или гетероциклоалкила.

[0347] В конкретных вариантах осуществления средство, ингибирующее

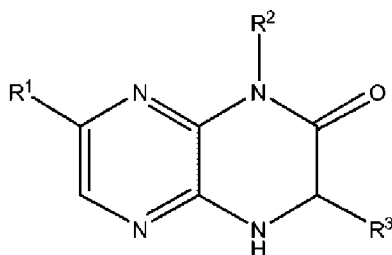
активность mTOR, имеет или включает формулу, приведенную в Формуле (II), где группы, которые являются «замещенными или незамещенными», если являются замещенными, то могут быть замещены одним или более из любых заместителей. Примеры заместителей включают те, которые встречаются в иллюстративных соединениях и вариантах осуществления, раскрытых в настоящем документе, а также галоген (например, хлор, иод, бром или фтор); C<sub>1-8</sub> алкил; C<sub>2-8</sub> алкенил; C<sub>2-8</sub> алкинил; гидроксил; C<sub>1-8</sub> алкоксил; amino; нитро; тиол; тиоэфир; имин; циано; амидо; фосфонато; фосфин; карбоксил; карбамоил; карбамат; ацеталь; мочевино; тиокарбонил; сульфонил; сульфонамид; сульфинил; кетон; альдегид; сложный эфир; ацетил; ацетокси; кислород (=O); галоалкил (например, трифторметил); замещенный аминоксил и аминокил; карбоциклический циклоалкил, который может быть моноциклическим или конденсированным, или не конденсированным полициклическим (например, циклопропил, циклобутил, циклопентил, или циклогексил), или гетероциклоалкил, который может быть моноциклическим или конденсированным, или не конденсированным полициклическим (например, пирролидинил, пиперидинил, пиперазинил, морфолинил, фуранил или тиазинил); карбоциклический или гетероциклический, моноциклический или конденсированный, или не конденсированный полициклический арил (например, фенил, нафтил, пирролил, индолил, фуранил, тиенил, имидазолил, оксазолил, изоксазолил, тиазолил, триазолил, тетразолил, пиразолил, пиридинил, хинолинил, изохинолинил, акридинил, пиразинил, пиридазинил, пиримидинил, бензимидазолил, бензотиенил или бензофуранил); amino (первичный, вторичный или третичный); -O-низший алкил; -O-арил; арил; арил-низший алкил; CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>; CONH<sub>2</sub>; OCH<sub>2</sub>CONH<sub>2</sub>; NH<sub>2</sub>; N(C<sub>1-4</sub> алкил)<sub>2</sub>; NHC(O)C<sub>1-4</sub> алкил; SO<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>; SO<sub>2</sub>C<sub>1-4</sub> алкил; OCHF<sub>2</sub>; CF<sub>3</sub>; OCF<sub>3</sub>; и такие группы также могут быть, необязательно, замещенными конденсированной кольцевой структурой или мостом, например, -OCH<sub>2</sub>O- или -O-низший алкилен-O-. Эти заместители могут, необязательно, быть дополнительно замещены заместителем, выбранным из таких групп.

[0348] В конкретных вариантах осуществления средство, которое имеет или включает формулу, приведенную в Формуле (II), представляет собой соединение 155. В конкретных вариантах осуществления средство, ингибирующее активность mTOR, представляет собой соединение 155. В некоторых аспектах соединение 155 представляет собой 6-(4-(2H-1,2,4-триазол-3-ил)фенил)-1-(2-(тетрагидро-2H-пиран-4-ил)этил)-1H-имидазо-[4,5-b]пиразин-2(3H)-он. В некоторых аспектах средство, ингибирующее активность mTOR, представляет собой 6-(4-(2H-1,2,4-триазол-3-ил)фенил)-1-(2-(тетрагидро-2H-пиран-4-ил)этил)-1H-имидазо-[4,5-b]пиразин-2(3H)-он, или его фармацевтически приемлемую соль или сольват. В конкретных аспектах соединение 155 имеет формулу:



(Соединение 155).

[0349] В конкретных вариантах осуществления средство, ингибирующее активность mTOR, имеет или включает формулу, приведенную в Формуле (III):



Формула (III)

где  $R^1$  представляет собой замещенный или незамещенный  $C_{1-8}$  алкил, замещенный или незамещенный арил, замещенный или незамещенный циклоалкил, замещенный или незамещенный гетероцикл, или замещенный или незамещенный гетероциклилалкил,

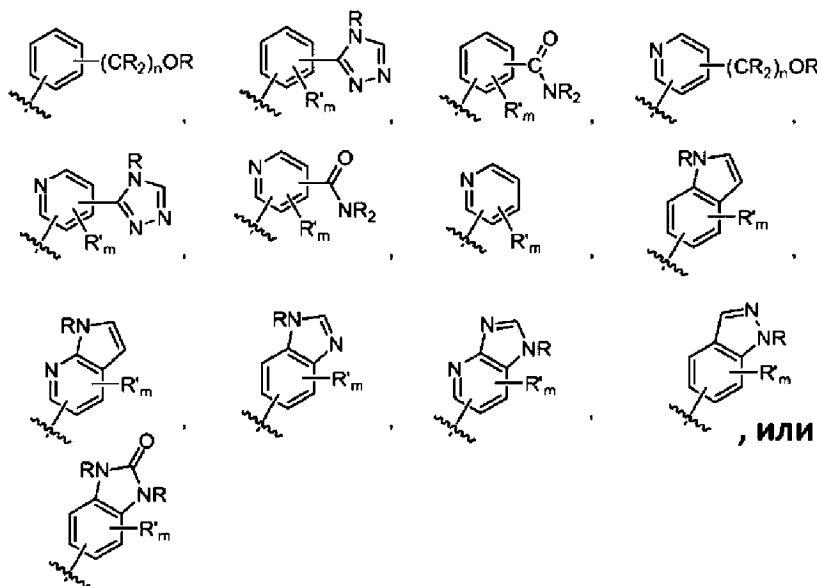
$R^2$  представляет собой H, замещенный или незамещенный  $C_{1-8}$  алкил, замещенный или незамещенный циклоалкил, замещенный или незамещенный гетероцикл, замещенный или незамещенный гетероциклилалкил, замещенный или незамещенный аралкил, или замещенный или незамещенный циклоалкилалкил, и

$R^3$  представляет собой H, или замещенный или незамещенный  $C_{1-8}$  алкил.

[0350] В некоторых вариантах осуществления средство, ингибирующее mTOR, представляет собой или содержит соединение формулы (III), или его фармацевтически приемлемую соль или сольват. В некоторых вариантах осуществления средство, ингибирующее активность mTOR, имеет или включает формулу, приведенную в Формуле (III), где  $R^1$  представляет собой замещенный или незамещенный арил, или замещенный или незамещенный гетероарил, например,  $R^1$  представляет собой фенил, пиридил, пиримидил, бензимидазолил, 1H-пирроло[2,3-b]пиридил, индазолил, индолил, 1H-имидазо[4,5-b]пиридил, 1H-имидазо[4,5-b]пиридин-2(3H)-онил, 3H-имидазо[4,5-b]пиридил или пиразолил, каждый, необязательно, замещенный. В конкретных вариантах осуществления средство, ингибирующее активность mTOR, имеет или включает формулу, приведенную в Формуле (III), где  $R^1$  представляет собой фенил, замещенный одним или более заместителями, независимо выбранными из группы, состоящей из замещенного или незамещенного  $C_{1-8}$  алкила (например, метила), замещенного или незамещенного гетероциклила (например, замещенного или незамещенного триазолила или пиразолила), аминокарбонила, галогена (например, фтора), циано, гидроксильного алкила и гидрокси. В

других вариантах осуществления  $R^1$  представляет собой пиридил, замещенный одним или более заместителями, независимо выбранными из группы, состоящей из замещенного или незамещенного  $C_{1-8}$  алкила (например, метила), замещенного или незамещенного гетероциклила (например, замещенного или незамещенного триазиолила), галогена, аминокарбонила, циано, гидроксильного алкила (например, гидроксипропила),  $-OR$ , и  $-NR_2$ , где каждый  $R$  независимо представляет собой  $H$ , или замещенный или незамещенный  $C_{1-4}$  алкил. В некоторых вариантах осуществления  $R^1$  представляет собой 1H-пирроло[2,3-b]пиридил или бензимидазолил, необязательно замещенный одним или более заместителями, независимо выбранными из группы, состоящей из замещенного или незамещенного  $C_{1-8}$  алкила, и  $-NR_2$ , где  $R$  независимо представляет собой  $H$ , или замещенный или незамещенный  $C_{1-4}$  алкил.

[0351] В некоторых вариантах осуществления средство, ингибирующее активность mTOR, имеет или включает формулу, приведенную в Формуле (III), где  $R^1$  представляет собой

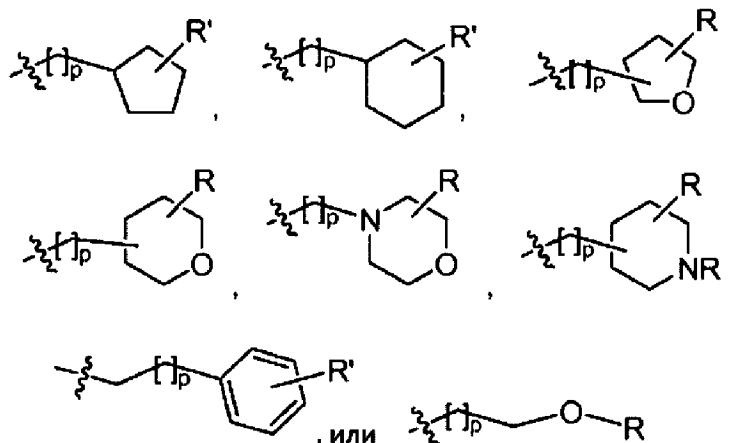


где  $R$  в каждом случае независимо представляет собой  $H$ , или замещенный или незамещенный  $C_{1-4}$  алкил (например, метил);  $R^1$  в каждом случае независимо представляет собой замещенный или незамещенный  $C_{1-4}$  алкил (например, метил), галоген (например, фтор), циано,  $-OR$ , или  $-NR_2$ ;  $m$  равно 0-3 и  $n$  равно 0-3. Следует понимать, что любой из заместителей  $R^1$  может быть присоединен к любому подходящему атому любого из колец в конденсированных кольцевых системах.

[0352] В некоторых вариантах осуществления соединений формулы (III)  $R^2$  представляет собой  $H$ , замещенный или незамещенный  $C_{1-8}$  алкил, замещенный или незамещенный циклоалкил, замещенный или незамещенный гетероциклил, замещенный или незамещенный  $C_{1-4}$  алкилгетероциклил, замещенный или незамещенный  $C_{1-4}$  алкиларил, или замещенный или незамещенный  $C_{1-4}$  алкилциклоалкил. Например,  $R^2$  представляет собой  $H$ , метил, этил, *n*-пропил, изопропил, *n*-бутил, втор-бутил, изобутил, трет-бутил, *n*-пентил, изопентил, циклопентил, циклогексил, тетрагидрофуранил,

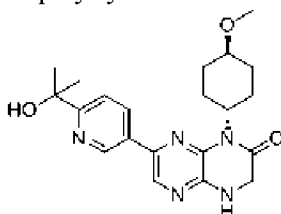
тетрагидропиранил, (C<sub>1-4</sub> алкил)фенил, (C<sub>1-4</sub> алкил)циклопропил, (C<sub>1-4</sub> алкил)циклобутил, (C<sub>1-4</sub> алкил)циклопентил, (C<sub>1-4</sub> алкил)циклогексил, (C<sub>1-4</sub> алкил)пирролидил, (C<sub>1-4</sub> алкил)пиперидил, (C<sub>1-4</sub> алкил)пиперазинил, (C<sub>1-4</sub> алкил)морфолинил, (C<sub>1-4</sub> алкил)тетрагидрофуранил или (C<sub>1-4</sub> алкил)тетрагидропиранил, каждый, необязательно, замещенный.

[0353] В конкретных вариантах осуществления R<sup>2</sup> представляет собой H, C<sub>1-4</sub> алкил, (C<sub>1-4</sub> алкил)(OR),



где R в каждом случае независимо представляет собой H, или замещенный или незамещенный C<sub>1-8</sub> алкил, R' в каждом случае независимо представляет собой H, -OR, циано, или замещенный или незамещенный C<sub>1-8</sub> алкил, и p равно 0-3.

[0354] В конкретных вариантах осуществления средство, которое имеет или включает формулу, приведенную в Формуле (III), представляет собой соединение 246. В конкретных вариантах осуществления средство, ингибирующее активность mTOR, представляет собой соединение 246. В некоторых аспектах соединение 246 представляет собой 7-(6-(2-гидроксипропан-2-ил)пиридин-3-ил)-1-((1r,4r)-4-метоксициклогексил)-3,4-дигидропиразино[2,3-b]пиазин-2(1H)-он. В некоторых аспектах средство, ингибирующее активность mTOR, представляет собой 7-(6-(2-гидроксипропан-2-ил)пиридин-3-ил)-1-((1r,4r)-4-метоксициклогексил)-3,4-дигидропиразино[2,3-b]пиазин-2(1H)-он, или его фармацевтически приемлемую соль или сольват. В конкретных аспектах Соединение 246 имеет Формулу:



Соединение 246.

### III. Способы долгосрочной стимуляции

[0355] В настоящем документе предложен способ долгосрочной стимуляции (в настоящем документе также называемый способом долговременной стимуляции),



который полезен, в частности, для оценки фенотипов, характеристик или активностей клеточной композиции, например, композиции клеток. В некоторых вариантах осуществления способ долгосрочной стимуляции представляет собой или включает инкубацию клеточной композиции, например, исходной композиции, содержащей клетки, экспрессирующие рекомбинантный рецептор, такой как CAR, в условиях, стимулирующих зависимость от рекомбинантного рецептора активность (например, CAR-зависимую активность) в клетках. В таких вариантах осуществления зависимость от рекомбинантного рецептора активность представляет собой активность, которая специфична для стимуляции рекомбинантного рецептора, например, CAR, например, за счет присутствия антигена или другого средства, узнаваемого антигенсвязывающим доменом рекомбинантного рецептора, например, CAR, или которая специфически стимулирует рекомбинантный рецептор. В некоторых аспектах клеточная композиция, например, исходная композиция, содержит Т-клетки, экспрессирующие рекомбинантный рецептор (например, CAR), содержащий внеклеточный антигенсвязывающий домен, который специфически связывает или узнает антиген. В некоторых аспектах инкубация приводит к получению Т-клеточной композиции, например, произведенных композиций, содержащих клетки, проявляющие признаки хронически стимулированных клеток или клеток, на которые длительно воздействует антиген.

[0356] В конкретных вариантах осуществления условия, стимулирующие активность рекомбинантного рецептора, например, CAR-зависимую активность, включают инкубацию клеточной композиции, например, исходной композиции, со связывающей молекулой, такой как связывающая молекула, которая связывает, например, специфически связывает, антигенсвязывающий домен рекомбинантного рецептора, например, CAR. В конкретных вариантах осуществления связывающая молекула связана с подложкой. В конкретных вариантах осуществления подложка представляет собой твердую подложку, такую как поверхность планшета или чашки для культивирования клеток, лунка в микропланшете или поверхность частицы или гранулы. В некоторых аспектах инкубацию выполняют или проводят в микропланшете или чашке для культивирования клеток, или лунке, к поверхности которой присоединены связывающие молекулы. В некоторых аспектах инкубацию выполняют или проводят в присутствии множества частиц или гранул, которые содержат связывающие молекулы. В некоторых аспектах связывающие молекулы связаны с поверхностью гранул или частиц. В некоторых вариантах осуществления инкубацию проводят или выполняют *in vitro* или *ex vivo*.

[0357] В различных вариантах осуществления клетки, например, клетки исходной композиции, инкубируют со связывающими молекулами в присутствии среды без дополнительных средств, стимулирующих деление, рост, размножение или активацию клеток. В некоторых вариантах осуществления клетки инкубируют с частицами в течение длительного периода времени, например, 14 дней, без каких-либо дополнительных манипуляций, например, замены среды, замены гранул, либо разделения или пересева

клеток.

[0358] В некоторых аспектах способ долгосрочной стимуляции включает инкубацию исходной композиции, например, клеточной композиции, представляющей собой экспрессирующую рекомбинантный рецептор клеточную композицию, в присутствии связывающей молекулы, которая связывает или узнает рекомбинантный рецептор. В некоторых аспектах период времени, выбранный для инкубации, представляет собой период времени, за который одна или более функций или активностей клеточных композиций начинают проявлять признаки, характерные для хронически стимулированных клеток или клеток, на которые длительно воздействует антиген, после завершения, или в конце, инкубации. В некоторых вариантах осуществления связывающая молекула представляет собой антиген (такой как рекомбинантный антиген или его фрагмент), который связывается или узнается рекомбинантным рецептором. В конкретных вариантах осуществления связывающая молекула представляет собой анти-ИД, которое связывает или узнает рекомбинантный рецептор. В некоторых вариантах осуществления такие признаки могут включать признаки сниженной жизнеспособности, активности или персистенции, либо повышенного истощения или дифференциации.

[0359] В конкретных вариантах осуществления способы долгосрочной стимуляции, предложенные в настоящем документе, полезны, в частности, для идентификации клеточных композиций, которые могут иметь желательные признаки при введении *in vivo*, такие как сохраняющаяся или продленная персистенция, жизнеспособность или активность. В некоторых вариантах осуществления проводят анализ на двух или более разных клеточных композициях для выявления различий, которые могут усиливать или продлевать персистенцию, активность или жизнеспособность, или уменьшать истощение или дифференциацию. В некоторых вариантах осуществления такие отличия могут включать, но без ограничения, аспекты производственного процесса, например, присутствие средств во время одного или более этапов, или процедуры способа генетической модификации, например, присутствие средств, ингибирующих активность киназы mTOR.

[0360] В конкретных вариантах осуществления способ долгосрочной стимуляции применяют для двух или более клеточных композиций с целью идентификации средств, повышающих или поддерживающих жизнеспособность, активность или персистенцию, или повышающих или поддерживающих экспрессию маркеров, например, биомаркеров, являющихся показателями повышенной жизнеспособности, активности или персистенции. В конкретных вариантах осуществления способ долгосрочной стимуляции применяют для двух или более клеточных композиций с целью идентификации различий в клеточных композициях, которые уменьшают или предотвращают истощение или дифференциацию (например, такую как дифференциация в состояние старения), либо уменьшают экспрессию маркеров, являющихся показателями повышенного истощения или дифференциации. В некоторых вариантах осуществления связывающая молекула конъюгирована или присоединена к твердой поверхности, такой как поверхность

планшета или чашки для культивирования клеток. В конкретных вариантах осуществления связывающие молекулы конъюгированы или присоединены к частицам, например, гранулам.

[0361] В конкретных вариантах осуществления способы долгосрочной стимуляции представляют собой или включают этапы инкубации клеток в присутствии частиц, например, гранул, содержащих связывающую молекулу, например, связывающую молекулу, которая связывает или узнает рекомбинантный рецептор.

[0362] В некоторых вариантах осуществления связывающая молекула представляет собой антиген, например, рекомбинантный антиген, или его фрагмент, узнаваемый или связываемый рекомбинантным рецептором. В конкретных вариантах осуществления антиген представляет собой полипептид, или часть полипептида, который связан с заболеванием, например, раком. В некоторых вариантах осуществления антиген представляет собой полипептид, либо вариант или фрагмент полипептида, который экспрессируется на поверхности клетки, связанной с заболеванием, например, раковой клетки и/или опухолевой клетки.

[0363] В некоторых вариантах осуществления антиген представляет собой, или включает, интегрин  $\alpha\beta6$  (интегрин  $\alpha\text{v}\beta6$ ), антиген созревания В-клеток (BCMA), B7-H3, B7-H6, карбоангидразу 9 (CA9, также известную как CAIX или G250), раково-тестикулярный антиген, раково-тестикулярный антиген 1B (STAG, также известный как NY-ESO-1 и LAGE-2), карциноэмбриональный антиген (CEA), циклин, циклин A2, лиганд 1 хемокина с мотивом C-C (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), эфрин B2, рецептор эфрина A2 (EPHa2), рецептор эстрогена, подобный Fc-рецептору белок 5 (FCRL5; также известный как гомолог Fc-рецептора 5 или FCRH5), эмбриональный ацетилхолиновый рецептор (эмбриональный AchR), фолат-связывающий белок (FBP), фолатный рецептор альфа, ганглиозид GD2, O-ацетилированный GD2 (OGD2), ганглиозид GD3, гликопротеин 100 (gp100), глипикан-3 (GPC3), связанный с G-белками рецептор 5D (GPRC5D), Her2/neu (рецептор тирозинкиназы erbB2), Her3 (erb-B3), Her4 (erb-B4), димеры erbB, человеческий высокомолекулярный антиген, связанный с меланомой (HMW-MAA), поверхностный антиген вируса гепатита В, человеческий лейкоцитарный антиген A1 (HLA-A1), человеческий лейкоцитарный антиген A2 (HLA-A2), рецептор альфа IL-22 (IL-22R $\alpha$ ), рецептор альфа 2 IL-13 (IL-13R $\alpha$ 2), рецептор домена киназной вставки (kdr), легкую цепь каппа, L1-молекулу клеточной адгезии (L1-CAM), CE7 эпитоп L1-CAM, представитель A семейства 8 белков, содержащих богатые лейцином повторы (LRRC8A), Lewis Y, меланома-ассоциированный антиген (MAGE)-A1, MAGE-A3, MAGE-A6, MAGE-A10, мезотелин (MSLN), с-Met, мышинный цитомегаловирус (CMV), муцин 1 (MUC1), MUC16, лиганды представителя D группы 2 естественных киллеров (NKG2D), мелан А (MART-1),

молекулу нейрональной клеточной адгезии (NCAM), онкоэмбриональный антиген, предпочтительно экспрессируемый антиген меланомы (PRAME), рецептор прогестерона, простатический специфический антиген, антиген простатических стволовых клеток (PSCA), простатический специфический мембранный антиген (PSMA), подобный тирозинкиназному рецептору рецептор-сироту 1 (ROR1), сурвивин, трофобластный гликопротеин (TPBG, также известный как 5T4), опухоль-ассоциированный гликопротеин 72 (TAG72), тирозиназа-зависимый белок 1 (TRP1, также известный как TYRP1 или gp75), тирозиназа-зависимый 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), антиген опухоли Вильмса 1 (WT-1), специфический для патогена или экспрессируемый патогеном антиген, или антиген, связанный с универсальным маркером, и/или биотинилированные молекулы, и/или молекулы, экспрессируемые HIV, HCV, HBV или другими патогенами. Антигены, являющиеся мишенью для рецепторов, в некоторых вариантах осуществления включают антигены, связанные с В-клеточными злокачественными новообразованиями, такие как любой из целого ряда 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. В некоторых вариантах осуществления антиген представляет собой или включает рекомбинантный BCMA, CD19, CD22 или ROR1.

[0364] В некоторых вариантах осуществления анти-ID представляет собой антиидиотипическое антитело, или его антигенсвязывающие фрагменты, которое специфически узнает целевое антитело, или антигенсвязывающий фрагмент (например, scFv), которое является частью внеклеточного антигенсвязывающего домена рекомбинантного рецептора. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен рекомбинантного рецептора содержит антитело, или антигенсвязывающий фрагмент (например, scFv), которое связывает антиген-мишень, например, антиген-мишень, связанный с, или экспрессируемый на клетке или ткани, связанной с заболеванием или состоянием, например, раком. В некоторых вариантах осуществления анти-ID представляет собой антиидиотипическое антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, которое специфически узнает целевое антитело, или антигенсвязывающий фрагмент, которое связывает интегрин  $\alpha\beta6$  (интегрин  $\alpha\text{v}\beta6$ ), антиген созревания В-клеток (BCMA), В7-Н3, В7-Н6, карбоангидразу 9 (CA9, также известную как CAIX или G250), раково-тестикулярный антиген, раково-тестикулярный антиген 1В (CTAG, также известный как NY-ESO-1 и LAGE-2), карциноэмбриональный антиген (CEA), циклин, циклин А2, лиганд 1 хемокина с мотивом С-С (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), эфрин

B2, рецептор эфрина A2 (EPHa2), рецептор эстрогена, подобный Fc-рецептору белок 5 (FCRL5; также известный как гомолог Fc-рецептора 5 или FCRH5), эмбриональный ацетилхолиновый рецептор (эмбриональный AchR), фолат-связывающий белок (FBP), фолатный рецептор альфа, ганглиозид GD2, O-ацетилированный GD2 (OGD2), ганглиозид GD3, гликопротеин 100 (gp100), глипикан-3 (GPC3), связанный с G-белками рецептор 5D (GPRC5D), Her2/neu (рецептор тирозинкиназы erbB2), Her3 (erb-B3), Her4 (erb-B4), димеры erbB, человеческий высокомолекулярный антиген, связанный с меланомой (HMW-MAA), поверхностный антиген вируса гепатита В, человеческий лейкоцитарный антиген A1 (HLA-A1), человеческий лейкоцитарный антиген A2 (HLA-A2), рецептор альфа IL-22 (IL-22R $\alpha$ ), рецептор альфа 2 IL-13 (IL-13R $\alpha$ 2), рецептор домена киназной вставки (kdr), легкую цепь каппа, L1-молекулу клеточной адгезии (L1-CAM), CE7 эпитоп L1-CAM, представителя A семейства 8 белков, содержащих богатые лейцином повторы (LRRC8A), Lewis Y, меланома-ассоциированный антиген (MAGE)-A1, MAGE-A3, MAGE-A6, MAGE-A10, мезотелин (MSLN), c-Met, мышинный цитомегаловирус (CMV), муцин 1 (MUC1), MUC16, лиганды представителя D группы 2 естественных киллеров (NKG2D), мелан А (MART-1), молекулу нейрональной клеточной адгезии (NCAM), онкоэмбриональный антиген, предпочтительно экспрессируемый антиген меланомы (PRAME), рецептор прогестерона, простатический специфический антиген, антиген простатических стволовых клеток (PSCA), простатический специфический мембранный антиген (PSMA), подобный тирозинкиназному рецептору рецептор-сироту 1 (ROR1), сурвивин, трофобластный гликопротеин (TPBG, также известный как 5T4), опухоль-ассоциированный гликопротеин 72 (TAG72), тирозиназа-зависимый белок 1 (TRP1, также известный как TYRP1 или gp75), тирозиназа-зависимый 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), антиген опухоли Вильмса 1 (WT-1), специфический для патогена или экспрессируемый патогеном антиген, или антиген, связанный с универсальным маркером, и/или биотинилированные молекулы, и/или молекулы, экспрессируемые HIV, HCV, HBV или другими патогенами. Антигены, являющиеся мишенью для рецепторов, в некоторых вариантах осуществления включают антигены, связанные с В-клеточными злокачественными новообразованиями, такие как любой из целого ряда 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. В некоторых вариантах осуществления анти-ID связывает антигенсвязывающий домен анти-CD19 CAR.

[0365] В некоторых вариантах осуществления частица (например, гранула) реагирует на магнитное поле. В некоторых вариантах осуществления частица представляет собой магнитную частицу (например, магнитную гранулу). В некоторых вариантах осуществления магнитная частица является парамагнитной. В конкретных вариантах осуществления магнитная частица является суперпарамагнитной. В конкретных

вариантах осуществления частицы, например, гранулы, не проявляют какие-либо магнитные свойства, когда на них не действует магнитное поле. В некоторых вариантах осуществления частицы или гранулы имеют диаметр от или от примерно 1 мкМ до 10 мкМ, включительно. В конкретных вариантах осуществления частицы, например, гранулы, имеют средний диаметр, составляющий или составляющий примерно 2,8 мкМ. В некоторых вариантах осуществления частицы, например, гранулы, имеют диаметр, составляющий или составляющий примерно 4,8 мкМ.

[0366] В конкретных вариантах осуществления клетки исходной композиции клеток инкубируют со связывающей молекулой, например, частицами или гранулами, содержащими связывающую молекулу, в течение, в течение примерно или в течение по меньшей мере 10 дней, 11 дней, 12 дней, 13 дней, 14 дней, 15 дней, 16 дней, 17 дней, 18 дней, 19 дней, 20 дней или 21 дня. В различных вариантах осуществления клетки или композиции клеток инкубируют со связывающей молекулой, например, частицами или гранулами, содержащими связывающую молекулу, в течение, или в течение примерно, срока от 10 дней до 21 дня, от 12 дней до 18 дней или от 14 дней до 16 дней, включительно. В конкретных вариантах осуществления клетки инкубируют со связывающей молекулой, например, частицами или гранулами, содержащими связывающую молекулу, в течение, в течение примерно или в течение по меньшей мере 14 дней. В конкретных вариантах осуществления клетки клеточной композиции инкубируют со связывающей молекулой, например, частицами или гранулами, содержащими связывающую молекулу, при температуре выше, чем комнатная температура. В некоторых вариантах осуществления инкубацию проводят при температуре выше примерно 25°C, например, как правило, выше или выше примерно 32°C, 35°C или 37°C. В некоторых вариантах осуществления обработку, контактирование или инкубацию проводят при температуре, составляющей или составляющей примерно 37°C ± 2°C, например, при температуре, составляющей или составляющей примерно 37°C.

[0367] В некоторых вариантах осуществления клетки инкубируют со связывающей молекулой, например, частицами или гранулами, содержащими связывающую молекулу, в присутствии среды без дополнительных средств, стимулирующих деление, рост, размножение или активацию клеток, например, Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления клетки инкубируют со связывающими молекулами в отсутствие любых рекомбинантных цитокинов. В конкретных вариантах осуществления инкубацию проводят постоянно, без прерывания. В конкретных вариантах осуществления инкубация происходит в статических условиях. В конкретных вариантах осуществления инкубация происходит без перфузии, перемешивания, качания или встряхивания. В некоторых аспектах связывающие молекулы присутствуют на всем протяжении инкубации. В конкретных вариантах осуществления связывающие молекулы не изменяются, и их не заменяют в процессе инкубации. В конкретных вариантах осуществления предусмотрено, что, поскольку в некоторых аспектах среда не содержит какие-либо рекомбинантные цитокины, то цитокины, присутствующие в среде в процессе инкубации, продуцированы

клетками, например, в ответ на взаимодействие между рекомбинантным рецептором клетки и связывающей молекулой частиц.

[0368] В некоторых вариантах осуществления количество связывающей молекулы, например, количество частиц или гранул, содержащих связывающие молекулы, достаточно для обеспечения от или от примерно 1 связывающей молекулы до  $10^{12}$  связывающих молекул на клетку, например, от или от примерно  $10^2$  связывающих молекул до  $10^{10}$  связывающих молекул, от  $10^3$  связывающих молекул до  $10^8$  связывающих молекул, от  $10^4$  связывающих молекул до  $10^6$  связывающих молекул, от 1 связывающей молекулы до  $10^2$  связывающих молекул, от  $10^2$  связывающих молекул до  $10^3$  связывающих молекул, от  $10^3$  связывающих молекул до  $10^4$  связывающих молекул, от  $10^4$  связывающих молекул до  $10^5$  связывающих молекул, от  $10^5$  связывающих молекул до  $10^6$  связывающих молекул, от  $10^5$  связывающих молекул до  $10^6$  связывающих молекул, от  $10^6$  связывающих молекул до  $10^7$  связывающих молекул, от  $10^7$  связывающих молекул до  $10^8$  связывающих молекул или от  $10^9$  связывающих молекул до  $10^{10}$  связывающих молекул, включительно. В некоторых вариантах осуществления количество связывающих молекул, например, количество частиц или гранул, содержащих связывающие молекулы, представляет собой количество, достаточное для обеспечения от  $10^4$  связывающих молекул до примерно  $10^6$  связывающих молекул, включительно, для каждой клетки. В некоторых вариантах осуществления количество частиц, например, гранул, включает примерно  $10^5$  связывающих молекул для каждой клетки.

[0369] В некоторых вариантах осуществления исходную композицию инкубируют с частицами, например, гранулами, содержащими связывающую молекулу, при соотношении суммарных клеток и частиц, например, гранул, составляющем от или от примерно 10:1 до 1:10, от 5:1 до 1:5, от 3:1 до 1:3 или от 2:1 до 1:2, в каждом случае включительно. В конкретных вариантах осуществления соотношение составляет от или от примерно 1:0,2 до 1:5, включительно. В некоторых вариантах осуществления соотношение суммарных клеток исходной композиции и частиц, например, гранул, составляет примерно 1:1.

[0370] В некоторых вариантах осуществления предложенные анализы могут быть использованы для сравнения разных клеток или клеточных композиций. Например, в некоторых вариантах осуществления две или более клеточных композиций, каждая из которых содержит клетки, экспрессирующие один и тот же рекомбинантный рецептор, например, один и тот же CAR, можно сравнивать путем инкубации клеток с одной и той же связывающей молекулой, например, частицами или гранулами, содержащими одну и ту же связывающую молекулу, которая связывает или узнает рекомбинантный рецептор. В конкретных вариантах осуществления две или более клеточные композиции получают в присутствии разных средств, например, средств, ингибирующих активность киназы mTOR. В конкретных вариантах осуществления клеточные композиции можно сравнивать с контрольной или эталонной клеточной композицией. В некоторых аспектах контрольные или эталонные клеточные композиции могут включать, но без ограничения,

клеточные композиции, которые не были подвергнуты какой-либо инкубации, клеточные композиции, которые не были инкубированы в присутствии частиц, например, гранул, содержащих связывающую молекулу, клеточные композиции, которые не содержат клетки, экспрессирующие рекомбинантный рецептор, клеточные композиции, которые получены другим способом генетической модификации, и/или клеточные композиции, генетически модифицированные в присутствии растворителя или контрольного соединения.

[0371] В конкретных вариантах осуществления две или более клеточные композиции, каждая из которых содержит клетки, экспрессирующие разные рекомбинантные рецепторы, например, разные CAR, можно сравнивать путем инкубации клеток со связывающими молекулами, например, с частицами, например, гранулами, содержащими разные связывающие молекулы, которые связывают или узнают разные рекомбинантные рецепторы.

[0372] В некоторых вариантах осуществления клетки оценивают в разные моменты времени в процессе инкубации. Например, в некоторых аспектах фенотип, характеристику или активность клеток из одной или более клеточных композиций оценивают в промежуточный момент времени, например, в момент времени, когда инкубация завершена на, на примерно, или на по меньшей мере 5%, 10%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 90%. В конкретных вариантах осуществления клетки оценивают один раз, два раза, три раза, четыре раза, пять раз, шесть раз, семь раз, восемь раз, девять раз, десять раз или более десяти раз в процессе инкубации. В конкретных вариантах осуществления клетки оценивают с разными интервалами в процессе инкубации, например, с интервалом примерно или по меньшей мере 6 часов, 12 часов, 18 часов, 24 часа, 36 часов, 48 часов, 1 день, 2 дня, 3 дня, 4 дня, 5 дней, 6 дней, 7 дней или 8 дней. В некоторых вариантах осуществления клетки оценивают каждый день. В некоторых вариантах осуществления клетки оценивают каждые три дня. В конкретных вариантах осуществления клетки оценивают каждые 7 дней.

[0373] В конкретных вариантах осуществления клетки, например, клетки произведенной композиции, оценивают в отношении активности, например, активности стимуляции антигеном, фенотипа или характеристики. В некоторых вариантах осуществления активность стимуляции антигеном оценивают в клетках клеточных композиций в процессе, или после, применения способа долгосрочной стимуляции, например, в процессе, или после, инкубации с частицами, например, гранулами, содержащими связывающие молекулы. В конкретных вариантах осуществления результаты оценки сравнивают с результатами оценки такой же или аналогичной активности в клетках из другой клеточной композиции, например, контрольной или эталонной клеточной композиции.

[0374] В некоторых вариантах осуществления активность представляет собой активность стимуляции антигеном. В конкретных вариантах осуществления предусмотрено, что активность стимуляции антигеном клеток, таких как Т-клетки,



экспрессирующие рекомбинантный рецептор, можно оценивать любым из целого ряда известных подходящих методов. В некоторых вариантах осуществления продуцирование одного или более цитокинов измеряют, обнаруживают и/или количественно определяют путем внутриклеточного окрашивания цитокинов. В некоторых аспектах внутриклеточное окрашивание цитокинов (ICS) с использованием метода проточной цитометрии представляет собой метод, который хорошо подходит для изучения продуцирования цитокинов на уровне одной клетки. В некоторых аспектах ICS можно использовать для обнаружения продуцирования и накопления цитокинов в эндоплазматическом ретикулуме после стимуляции клеток, например, клеткой, экспрессирующей антиген, или частицей, например, гранулой, с конъюгированным антигеном, что позволяет идентифицировать клеточные популяции, которые являются положительными или отрицательными по продуцированию конкретного цитокина, или разделять клетки, продуцирующие на высоком уровне и на низком уровне, на основании пороговых значений. ICS также можно использовать в сочетании с другими протоколами проточной цитометрии для иммунофенотипирования при помощи клеточных поверхностных маркеров, например, CD4 или CD8, для оценки продуцирования цитокинов в конкретной подгруппе клеток. Другие методы измерения или обнаружения продуцирования цитокинов на уровне одной клетки включают, но без ограничения, ELISPOT, лимитирующее разведение и клонирование Т-клеток.

[0375] В некоторых вариантах осуществления активность стимулирования антигеном представляет собой продуцирование одного или более цитокинов. Цитокины, которые могут быть продуцированы в ответ на стимуляцию антигеном, могут включать, но без ограничения, IL-1, IL-1 $\beta$ , IL-2, sIL-2Ra, IL-3, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12, IL-13, IL 27, IL-33, IL-35, TNF, TNF-альфа, CXCL2, CCL2, CCL3, CCL5, CCL17, CCL24, PGD2, LTB4, интерферон-гамма (IFN- $\gamma$ ), гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (GM-CSF), воспалительный белок макрофагов (MIP)-1a, MIP-1b, Flt-3L, фракталкин и/или IL-5. В некоторых вариантах осуществления один или более цитокинов представляют собой или включают один или более из IL-2, IFN-гамма или TNF-альфа. В некоторых вариантах осуществления секрецию цитокинов оценивают путем измерения, обнаружения или определения количества или концентрации внеклеточных цитокинов после совместного культивирования с экспрессирующими антиген клетками или после инкубации с частицами, например, гранулами, содержащими присоединенный антиген или фрагменты антигена.

[0376] В конкретных вариантах осуществления активность стимулирования антигеном представляет собой цитолитическую (цитотоксическую) активность. В некоторых вариантах осуществления цитолитическую активность оценивают, подвергая воздействию, инкубируя и/или приводя в контакт, клетки композиции, например, клетки, экспрессирующие рекомбинантный рецептор, с клеткой-мишенью, экспрессирующей антиген или эпитоп, узнаваемый рекомбинантным рецептором. Цитолитическую активность можно измерять непосредственно или опосредованно, измеряя количество

клеток-мишеней с течением времени. Например, клетки-мишени можно инкубировать с детектируемым маркером перед проведением инкубации с экспрессирующими рекомбинантный рецептор клетками, таким как маркер, который может быть обнаружен в случае лизиса клетки-мишени, или детектируемым маркером, который может быть обнаружен только в жизнеспособных клетках-мишенях. Эти результаты позволяют прямо или косвенно определять количество клеток-мишеней и/или гибель клеток-мишеней, и могут быть получены в различные моменты времени в процессе анализа. Уменьшение количества клеток-мишеней и/или увеличение гибели клеток-мишеней указывают на цитолитическую активность клеток. Соответствующие методы проведения цитолитических анализов известны в данной области, и включают, но без ограничения, анализы с высвобождением хрома-51, анализы с не радиоактивным хромом, анализы методом проточной цитометрии, в которых используют флуоресцентные красители, такие как сложный эфир карбоксифлуоресцеина сукцинимидила (CFSE), РКН-2 и РКН-26.

[0377] В конкретных вариантах осуществления клетки, например, клетки, экспрессирующие рекомбинантный рецептор, клеточной композиции оценивают в отношении одной или более характеристик или фенотипов в процессе или после анализа, например, в процессе или после инкубации с частицами, например, гранулами, содержащими связывающий рецептор. В некоторых вариантах осуществления одна или более характеристик, или фенотипов, представляют собой, или связаны с одним или более из активации, истощения или дифференциации. В конкретных вариантах осуществления один или более фенотипов, или характеристик, оценивают путем измерения, обнаружения или определения наличия, отсутствия, количества или уровня одного или более маркеров, например, биомаркеров.

[0378] В некоторых вариантах осуществления оценка экспрессии маркера, например, маркера, который положительно или отрицательно связан с активацией, истощением или дифференциацией, представляет собой или включает оценку, измерение, обнаружение и/или определение уровня, количества или концентрации маркера в образце. В конкретных вариантах осуществления маркер представляет собой продукт гена, например, любую биологическую молекулу, которая собирается, создается и/или синтезируется на основании информации, закодированной геном, и может включать полинуклеотиды и/или полипептиды. В конкретных вариантах осуществления уровень, количество или концентрацию маркера можно преобразовывать (например, нормировать) или непосредственно анализировать (например, без обработки). В некоторых вариантах осуществления маркер представляет собой белок. В конкретных вариантах осуществления маркер представляет собой полинуклеотид, например, мРНК, или белок, который закодирован геном.

[0379] В конкретных вариантах осуществления количество или уровень маркера, который представляет собой полинуклеотид, можно оценивать, измерять, обнаруживать и/или определять любыми подходящими известными методами. Например, в некоторых вариантах осуществления количество или уровень полинуклеотидного маркера можно

оценивать, измерять, обнаруживать и/или определять методом полимеразной цепной реакции (ПЦР), включая методы ПЦР с обратной транскриптазой (ОТ), капельной цифровой ПЦР, ПЦР в реальном времени и количественной ПЦР (включая, например, TAQMAN<sup>®</sup>, молекулярный маяк, LIGHTUP<sup>™</sup>, SCORPION<sup>™</sup>, SIMPLEPROBES<sup>®</sup>; смотри, например, патенты США №№ 5538848; 5925517; 6174670; 6329144; 6326145 и 6635427); методом нозерн-блоттинга; саузерн-блоттинга, например, продуктов и производных обратной транскрипции; методами на основе матриц, матриц блоттинга, микрочипов или *in situ* синтезированных матриц; и методом секвенирования, например, секвенирования путем синтеза, пиросеквенирования, дидезокси-секвенирования или секвенирования путем лигирования, или любыми другими методами, известными в данной области, например, которые описаны в публикациях Shendure et al., Nat. Rev. Genet. 5:335-44 (2004) или Nowrousian, Euk. Cell 9(9): 1300-1310 (2010), включая такие специфические платформы секвенирования, как HELICOS<sup>®</sup>, ROCHE<sup>®</sup> 454, ILLUMINA<sup>®</sup>/SOLEXA<sup>®</sup>, ABI SOLiD<sup>®</sup> и POLONATOR<sup>®</sup>. В конкретных вариантах осуществления уровни продуктов генов в форме нуклеиновой кислоты измеряют методом кОТ-ПЦР. В некоторых вариантах осуществления в кОТ-ПЦР используют три набора нуклеиновых кислот для каждого гена, при этом три нуклеиновые кислоты включают пару праймеров, наряду с зондом, который связывается между областями нуклеиновой кислоты-мишени, где связываются праймеры; известное коммерческое название - анализ TAQMAN<sup>®</sup>.

[0380] В конкретных вариантах осуществления экспрессию двух или более полинуклеотидных маркеров измеряют или оценивают одновременно. В конкретных вариантах осуществления используют мультиплексную ПЦР, например, мультиплексную ОТ-ПЦР, позволяющую оценивать, измерять, обнаруживать и/или определять уровень, количество или концентрацию двух или более продуктов генов. В некоторых вариантах осуществления используют микрочипы (например, матрицы типа AFFYMETRIX<sup>®</sup>, AGILENT<sup>®</sup> и ILLUMINA<sup>®</sup>) для оценки, измерения, обнаружения и/или определения уровня, количества или концентрации двух или более продуктов генов. В некоторых вариантах осуществления используют микрочипы для оценки, измерения, обнаружения и/или определения уровня, количества или концентрации полинуклеотида кДНК, который получен из РНК-продукта гена.

[0381] В некоторых вариантах осуществления экспрессию одного или более полинуклеотидных маркеров определяют путем секвенирования полинуклеотида мРНК или кДНК маркера, которая получена из мРНК маркера. В некоторых вариантах осуществления секвенирование проводят методом секвенирования не по Сенгеру и/или методом секвенирования нового поколения (NGS). Примеры методов секвенирования нового поколения включают, но без ограничения, массивно-параллельное опознавательное секвенирование (MPSS), полони-секвенирование, пиросеквенирование, секвенирование с обратимым окрашиванием красителями-терминаторами, SOLiD секвенирование, ионное полупроводниковое секвенирование, секвенирование ДНК на наносферах, секвенирование отдельных молекул в гелиоскопе, секвенирование отдельных

молекул в реальном времени (SMRT), секвенирование отдельных молекул в реальном времени (RNAP) и секвенирование через нанопоры.

[0382] В конкретных вариантах осуществления маркер представляет собой белок или его фрагмент. В конкретных вариантах осуществления один или более белков-маркеров определяют любыми подходящими методами, известными в данной области. Подходящие методы оценки, измерения, обнаружения и/или определения уровня, количества или концентрации одного или более белков-маркеров включают, но без ограничения, обнаружение в иммуноанализах, аптамерные технологии на основе нуклеиновых кислот или белков, ВЭЖХ (высокоэффективную жидкостную хроматографию), секвенирование пептидов (например, секвенирование методом деградации по Эдману) или масс-спектрометрию (например МС/МС), необязательно, связанную с ВЭЖХ), а также адаптированные для микрочипов варианты любых из вышеперечисленных (включая матрицы нуклеиновых кислот, антител или белок-белковые (то есть, не антител) матрицы). В некоторых вариантах осуществления иммуноанализ представляет собой или включает методы или анализы, позволяющие обнаруживать белки за счет иммунных реакций, например, путем обнаружения связывания антитела или антигенсвязывающего фрагмента антитела с продуктом гена. Иммуноанализы включают, но без ограничения, количественные иммуноцитохимические или иммуногистохимические анализы, ELISA (включая прямые, непрямые, «сэндвич», конкурентные, множественные и портативные варианты ELISA (смотри, например, патент США № 7510687)), вестерн-блоттинг (включая блоттинг в одном, двух или более измерениях, или другие хроматографические методы, необязательно, включая секвенирование пептидов), иммуноферментный анализ (EIA), RIA (радиоиммунный анализ) и SPR (поверхностный плазмонный резонанс).

[0383] В некоторых вариантах осуществления белок-маркер измеряют, обнаруживают или количественно определяют методом проточной цитометрии. В некоторых аспектах проточная цитометрия является лазерной или импедансной, биофизической технологией, используемой для обнаружения маркера путем суспендирования клеток в потоке жидкости и пропускания их через электронный детектор. Маркеры, присутствующие на клетках, могут быть мечены, например, антителом с флуоресцентной меткой, для обнаружения методом проточной цитометрии. В некоторых аспектах проточную цитометрию используют для измерения, обнаружения или определения присутствия, отсутствия, количества или уровня маркера, присутствующего в популяции клеток. В некоторых аспектах популяция клеток может представлять собой суммарные или суммарные жизнеспособные клетки клеточной композиции, или подмножества клеток из клеточной композиции, например, клетки, положительные по рекомбинантному рецептору, CD4<sup>+</sup> Т-клетки или CD8<sup>+</sup> Т-клетки.

[0384] В конкретных вариантах осуществления маркер положительно связан или коррелирует с активацией или состоянием, подобным активации. В некоторых вариантах осуществления маркер представляет собой или включает CD25, CD26, CD27, CD28, CD30,

CD71, CD154, CD40L, CD127, LAG3 или Ki67. В некоторых вариантах осуществления маркер положительно связан или коррелирует с истощением или состоянием, связанным с истощением. В конкретных вариантах осуществления маркер представляет собой или включает один или более из CTLA-4, FOXP3, PD-1, TIGIT, LAB-3, 2B4, VISTA, TIM3, VISTA или CD96. В некоторых вариантах осуществления биомаркер связан с дифференциацией Т-клетки. В конкретных вариантах осуществления маркер представляет собой или включает один или более из CD25, CD45RO, CD56, KLRG1, CD95 и/или один или более из CD45RA, CD27, CD28, CD62L и CCR7. В некоторых вариантах осуществления клетки, например, клетки произведенной композиции, оценивают в отношении клеток, поверхность которых положительна по маркеру активации Т-клеток, выбранному из группы, состоящей из CD45RA, CD27, CD28, CD62L и CCR7; и/или поверхность которых отрицательна по маркеру, выбранному из группы, состоящей из CD25, CD45RO, CD56, KLRG1; и/или которые имеют низкую экспрессию CD95; и/или у которых отсутствует внутриклеточная экспрессия цитокина, выбранного из группы, состоящей из IL-2, IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-10. В некоторых случаях произведенную композицию оценивают в отношении клеток, которые являются CD45RA+, CD27+, CCR7+ и/или CD45RO- клетками.

[0385] В некоторых вариантах осуществления клетки произведенной клеточной композиции проявляют признаки клеток, которые были подвергнуты продолжительной или хронической стимуляции, после способа долгосрочной стимуляции, например, после инкубации с частицами, например, гранулами, содержащими связывающую молекулу. В некоторых вариантах осуществления клетки, экспрессирующие рекомбинантный рецептор, клеточной композиции, например, эталонной или контрольной клеточной композиции, проявляют признаки клеток, которые были подвергнуты продолжительной или хронической стимуляции, после анализа, например, после инкубации с частицами, например, гранулами, содержащими связывающую молекулу.

#### **IV. Рекомбинантные рецепторы**

[0386] В некоторых вариантах осуществления клетки, которые обработаны, подвергнуты манипуляциям, генетически модифицированы и/или получены способами, предложенными в настоящем документе, содержат или экспрессируют, или генетически модифицированы, чтобы содержать или экспрессировать, рекомбинантный белок, такой как рекомбинантный рецептор, например, химерный антигенный рецептор (CAR) или Т-клеточный рецептор (TCR). В конкретных вариантах осуществления способы, предложенные в настоящем документе, приводят к получению и/или способны приводить к получению клеток или популяций, или композиций, содержащих и/или обогащенных по клеткам, которые генетически модифицированы для экспрессии или содержания рекомбинантного белка. В некоторых вариантах осуществления CD4+ Т-клетки, или популяции, или композиции CD4+ Т-клеток, обрабатывают, подвергают манипуляциям, генетически модифицируют и/или производят.

[0387] В некоторых вариантах осуществления клетки содержат одну или более

нуклеиновых кислот, введенных методами генетической инженерии, и вследствие этого, экспрессируют рекомбинантные или генетически модифицированные продукты таких нуклеиновых кислот. В некоторых вариантах осуществления перенос генов выполняют, сначала стимулируя клетки, например, путем объединения их со стимулом, который вызывает такой ответ, как пролиферация, выживание и/или активация, например, что определяют по экспрессии цитокина или маркера активации, с последующей трансдукцией активированных клеток и размножением в культуре до количеств, достаточных для клинического применения.

[0388] Клетки, как правило, экспрессируют рекомбинантные рецепторы, такие как антигенные рецепторы, включая функциональные не-TCR антигенные рецепторы, например, химерные антигенные рецепторы (CAR), и другие антигенсвязывающие рецепторы, такие как трансгенные Т-клеточные рецепторы (TCR). В число рецепторов также входят и другие химерные рецепторы.

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

[0389] В некоторых вариантах осуществления предложенных способов и вариантов применения химерные рецепторы, такие как химерные антигенные рецепторы, содержат один или более доменов, сочетая лиганд-связывающий домен (например, антитело или фрагмент антитела), который обеспечивает специфичность для нужного антигена (например, опухолевого антигена), с внутриклеточными сигнальными доменами. В некоторых вариантах осуществления внутриклеточный сигнальный домен представляет собой часть активирующего внутриклеточного домена, такого как Т-клеточный активирующий домен, обеспечивающего основной сигнал активации. В некоторых вариантах осуществления внутриклеточный сигнальный домен содержит, или также содержит, костимулирующий сигнальный домен, содействующий эффекторным функциям. В некоторых вариантах осуществления химерные рецепторы, будучи введены генно-инженерными методами в иммунные клетки, могут модулировать активность Т-клеток и, в некоторых случаях, могут модулировать дифференциацию или гомеостаз Т-клеток, следствием чего являются генетически модифицированные клетки с повышенной выживаемостью, более длительным выживанием и/или персистенцией *in vivo*, для использования в методах адоптивной клеточной терапии.

[0390] Иллюстративные антигенные рецепторы, включая CAR, а также способы генетической модификации и введения таких рецепторов в клетки, включают те, которые описаны, например, в публикациях международных патентных заявок с номерами WO200014257, WO2013126726, WO2012/129514, WO2014031687, WO2013/166321, WO2013/071154, WO2013/123061, публикациях патентных заявок США с номерами US2002131960, US2013287748, US20130149337, патентах США №№ 6451995, 7446190, 8252592, 8339645, 8398282, 7446179, 6410319, 7070995, 7265209, 7354762, 7446191, 8324353 и 8479118, и Европейской патентной заявке с номером EP2537416, и/или те, которые описаны в публикациях 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, описанный в патенте США №: 7446190, и те, которые описаны в публикации международной патентной заявки № WO/2014055668 A1. Примеры CAR включают CAR, раскрытые в любой из вышеперечисленных публикаций, например, в WO2014031687, US 8339645, US 7446179, US 2013/0149337, патенте США № 7446190, патенте США № 8389282, 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). Смотри также WO2014031687, US 8339645, US 7446179, US 2013/0149337, патент США № 7446190 и патент США № 8389282.

[0391] Химерные рецепторы, такие как CAR, как правило, включают внеклеточный антигенсвязывающий домен, например, часть молекулы антитела, как правило, переменную область тяжелой цепи (VH) и/или переменную область легкой цепи (VL) антитела, например, scFv фрагмент антитела.

[0392] В некоторых вариантах осуществления антиген, являющийся мишенью для рецептора, представляет собой полипептид. В некоторых вариантах осуществления он представляет собой углевод или другую молекулу. В некоторых вариантах осуществления антиген избирательно экспрессируется или избыточно экспрессируется на клетках, связанных с заболеванием или состоянием, например, опухолевых или патогенных клетках, в сравнении с нормальными или не являющимися мишенями клетками или тканями. В других вариантах осуществления антиген экспрессируется на нормальных клетках и/или экспрессируется на генетически модифицированных клетках.

[0393]

[0394] В некоторых вариантах осуществления антиген представляет собой, или включает, интегрин  $\alpha\beta6$  (интегрин  $\alpha\text{v}\beta6$ ), антиген созревания В-клеток (BCMA), B7-H3, B7-H6, карбоангидразу 9 (CA9, также известную как CAIX или G250), раково-тестикулярный антиген, раково-тестикулярный антиген 1B (CTAG, также известный как NY-ESO-1 и LAGE-2), карциноэмбриональный антиген (CEA), циклин, циклин A2, лиганд 1 хемокина с мотивом C-C (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), эфрин B2, рецептор эфрина A2 (EPHa2), рецептор эстрогена, подобный Fc-рецептору белок 5 (FCRL5; также известный как гомолог Fc-рецептора 5 или FCRH5), эмбриональный ацетилхолиновый рецептор (эмбриональный AchR), фолат-связывающий белок (FBP), фолатный рецептор альфа, ганглиозид GD2, O-ацетилованный GD2 (OGD2), ганглиозид GD3, гликопротеин 100 (gp100), глипикан-3 (GPC3), связанный с G-белками рецептор 5D (GPRC5D), Her2/neu (рецептор тирозинкиназы erbB2), Her3 (erb-B3), Her4 (erb-B4), димеры erbB, человеческий высокомолекулярный антиген, связанный с меланомой (HMW-MAA), поверхностный антиген вируса гепатита В, человеческий лейкоцитарный антиген A1 (HLA-A1),

человеческий лейкоцитарный антиген A2 (HLA-A2), рецептор альфа IL-22 (IL-22R $\alpha$ ), рецептор альфа 2 IL-13 (IL-13R $\alpha$ 2), рецептор домена киназной вставки (kdr), легкую цепь каппа, L1-молекулу клеточной адгезии (L1-CAM), CE7 эпитоп L1-CAM, представитель A семейства 8 белков, содержащих богатые лейцином повторы (LRRC8A), Lewis Y, меланома-ассоциированный антиген (MAGE)-A1, MAGE-A3, MAGE-A6, MAGE-A10, мезотелин (MSLN), с-Met, мышинный цитомегаловирус (CMV), муцин 1 (MUC1), MUC16, лиганды представителя D группы 2 естественных киллеров (NKG2D), мелан А (MART-1), молекулу нейрональной клеточной адгезии (NCAM), онкоэмбриональный антиген, предпочтительно экспрессируемый антиген меланомы (PRAME), рецептор прогестерона, простатический специфический антиген, антиген простатических стволовых клеток (PSCA), простатический специфический мембранный антиген (PSMA), подобный тирозинкиназному рецептору рецептор-сироту 1 (ROR1), сурвивин, трофобластный гликопротеин (TPBG, также известный как 5T4), опухоль-ассоциированный гликопротеин 72 (TAG72), тирозиназа-зависимый белок 1 (TRP1, также известный как TYRP1 или gp75), тирозиназа-зависимый 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), антиген опухоли Вильмса 1 (WT-1), специфический для патогена или экспрессируемый патогеном антиген, или антиген, связанный с универсальным маркером, и/или биотинилированные молекулы, и/или молекулы, экспрессируемые HIV, HCV, HBV или другими патогенами. Антигены, являющиеся мишенью для рецепторов, в некоторых вариантах осуществления включают антигены, связанные с В-клеточными злокачественными новообразованиями, такие как любой из целого ряда 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.

[0395] В некоторых вариантах осуществления антиген представляет собой или включает специфический для патогена или экспрессируемый патогеном антиген. В некоторых вариантах осуществления антиген представляет собой вирусный антиген (такой как вирусный антиген из HIV, HCV, HBV и так далее), бактериальные антигены и/или паразитарные антигены. В некоторых вариантах осуществления антигены, являющиеся мишенью для рецепторов, включают антигены, связанные с В-клеточными злокачественными новообразованиями, такие как любой из целого ряда известных В-клеточных маркеров. В некоторых вариантах осуществления антиген, являющийся мишенью для рецептора, представляет собой CD20, CD19, CD22, ROR1, CD45, CD21, CD5, CD33, Ig каппа, Ig лямбда, CD79a, CD79b или CD30.

[0396] В некоторых вариантах осуществления антиген антигенсвязывающего домена представляет собой CD19. В некоторых вариантах осуществления scFv содержит VH и VL, полученные из антитела, или фрагмента антитела, специфического для CD19. В некоторых вариантах осуществления антитело, или фрагмент антитела, которое связывает CD19, представляет собой мышинное антитело, такое как FMC63 и SJ25C1. В некоторых



вариантах осуществления антитела, или фрагмент антитела, представляет собой человеческое антитело, например, описанное в публикации патента США № US 2016/0152723.

[0397] В настоящем документе термин «антитело» используется в самом широком смысле и охватывает поликлональные и моноклональные антитела, включая интактные антитела и функциональные (антигенсвязывающие) фрагменты антител, в том числе антигенсвязывающие (Fab) фрагменты, фрагменты F(ab')<sub>2</sub>, фрагменты Fab', фрагменты Fv, рекомбинантные фрагменты IgG (rIgG), переменные области тяжелой цепи (V<sub>H</sub>), способные специфически связывать антиген, одноцепочечные фрагменты антител, в том числе одноцепочечные переменные фрагменты (scFv), и однодоменные фрагменты антител (например, sdAb, sdFv, нанотело). Термин охватывает генетически модифицированные и/или иным образом модифицированные формы иммуноглобулинов, такие как интратела, пептитела, химерные антитела, полностью человеческие антитела, гуманизированные антитела и гетероконъюгатные антитела, мультиспецифические, например, биспецифические или триспецифические, антитела, диатела, триатела и тетраатела, тандемные ди-scFv, тандемные три-scFv. Если нет иных указаний, термин «антитело» следует понимать, как охватывающий функциональные фрагменты антител, в настоящем документе также называемые «антигенсвязывающими фрагментами». Термин также охватывает интактные или полноразмерные антитела, включая антитела любого класса или подкласса, в том числе IgG и его подклассов, IgM, IgE, IgA и IgD.

[0398] Термины «определяющая комплементарная область» и «CDR», синонимами которых являются термины «гиперварибельная область» или «HVR», известны в данной области и означают состоящие из несмежных участков последовательности аминокислот в переменных областях антитела, которые придают антигенную специфичность и/или аффинность связывания. Как правило, существуют три CDR в каждой переменной области тяжелой цепи (CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3) и три CDR в каждой переменной области легкой цепи (CDR-L1, CDR-L2, CDR-L3). Термины «каркасные области» и «FR», как известно в данной области, означают не-CDR части переменных областей тяжелых и легких цепей. Как правило, существуют четыре FR в каждой полноразмерной переменной области тяжелой цепи (FR-H1, FR-H2, FR-H3 и FR-H4) и четыре FR в каждой полноразмерной переменной области легкой цепи (FR-L1, FR-L2, FR-L3 и FR-L4).

[0399] Точные границы аминокислотной последовательности конкретной CDR или FR можно с легкостью определять с использованием любой из ряда хорошо известных систем, включая те, которые описаны в публикации Kabat et al. (1991), «Sequences of Proteins of Immunological Interest,» 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (система нумерации «Kabat»); Al-Lazikani et al., (1997) JMB 273,927-948 (система нумерации «Chothia»); 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» система 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 (система 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, (система нумерации «Aho»); и Martin et al., «Modeling antibody hypervariable loops: a combined algorithm» PNAS, 1989, 86(23):9268-9272, (система нумерации «AbM»).

[0400] Границы конкретной CDR или FR могут варьироваться в зависимости от системы, используемой для определения. Например, система Kabat основана на структурных выравниваниях, в то время как система Chothia основана на структурной информации. Нумерация по системам как Kabat, так и Chothia, основана на наиболее распространенных длинах последовательностей областей антител, со вставками, обозначенными буквами, например, «30a», и делециями, имеющими место в некоторых антителах. В двух системах определенные вставки и делеции («indel») размещены в разных положениях, что приводит к различающимся нумерациям. Контактная система основана на анализе кристаллических структур комплексов и во многих отношениях аналогична системе нумерации Chothia. Система AbM представляет собой компромисс между определениями Kabat и Chothia, эта система используется в программе моделирования антител AbM (Oxford Molecular).

[0401] В Таблице 1, ниже, приведены иллюстративные границы CDR-L1, CDR-L2, CDR-L3 и CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3 в соответствии с системами Kabat, Chothia, AbM и контактной системой, соответственно. Для CDR-H1 нумерация остатков приведена с использованием систем нумерации как Kabat, так и Chothia. FR расположены между CDR, например, FR-L1 расположен перед CDR-L1, FR-L2 расположен между CDR-L1 и CDR-L2, FR-L3 расположен между CDR-L2 и CDR-L3, и так далее. Следует отметить, что, поскольку в представленной системе нумерации Kabat вставки размещены на H35A и H35B, конец петли CDR-H1 по Chothia, при нумерации с использованием нумерации Kabat, варьируется между H32 и H34, в зависимости от длины петли.

**Таблица 1. Границы CDR в соответствии с разными системами нумерации.**

CDR	Kabat	Chothia	AbM	Контактная
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 Kabat <sup>1</sup> )	H31--H35B	H26--H32,34	H26--H35B	H30--H35B
CDR-H1 (нумерация Chothia <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

[0402] Таким образом, если не указано иначе, следует понимать, что «CDR» или «определяющая комплементарность область», или индивидуально указанная CDR (например, CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3), конкретного антитела или его области, такой как его переменная область, охватывает (или конкретную) определяющую комплементарность область, определенную в соответствии с любой из вышеуказанных систем, или другими известными системами. Например, если указано, что конкретная CDR (например, CDR-H3) содержит аминокислотную последовательность соответствующей CDR в конкретной аминокислотной последовательности области  $V_H$  или  $V_L$ , понятно, что такая CDR имеет последовательность соответствующей CDR (например, CDR-H3) в переменной области, определенную в соответствии с любой из вышеуказанных систем, или другими известными системами. В некоторых вариантах осуществления указаны конкретные последовательности CDR. Иллюстративные последовательности CDR предложенных антител описаны с использованием разных систем нумерации, хотя понятно, что предложенное антитело может содержать CDR, описанную в соответствии с любой из вышеуказанных систем, или другими системами нумерации, известными квалифицированному специалисту.

[0403] Аналогично, если не указано иначе, следует понимать, что FR, или индивидуально указанная FR (например, FR-H1, FR-H2, FR-H3, FR-H4), конкретного антитела или его области, такой как его переменная область, охватывает (или конкретную) каркасную область, определенную в соответствии с любой из известных систем. В некоторых случаях система определения конкретной CDR, FR, или областей FR или областей CDR, указана, например, CDR по определению Kabat, Chothia, AbM или контактной системе, или в соответствии с другими известными системами. В других случаях приведена конкретная аминокислотная последовательность CDR или FR.

[0404] Термин «переменная область», или «переменный домен», означает домен тяжелой или легкой цепи антитела, который участвует в связывании антитела с антигеном. Переменные домены тяжелой цепи и легкой цепи ( $V_H$  и  $V_L$ , соответственно) естественного антитела, как правило, имеют сходные структуры, при этом каждый домен содержит четыре консервативные каркасные области (FR) и три области CDR. (Смотри, например, Kindt et al. *Kuby Immunology*, 6th ed., W.H. Freeman и Co., page 91 (2007). Отдельного домена  $V_H$  или  $V_L$  может быть достаточно для придания специфичности связывания антигена. Кроме того, антитела, которые связывают конкретный антиген, могут быть выделены с использованием домена  $V_H$  или  $V_L$  из антитела, связывающего антиген, для скрининга библиотеки комплементарных доменов  $V_L$  или  $V_H$ , соответственно. Смотри, например, Portolano et al., *J. Immunol.* 150:880-887 (1993); Clarkson et al., *Nature* 352:624-628 (1991).

[0405] В число антител, включенных в предложенный CAR, входят фрагменты

антител. Термин «фрагмент антитела» или «антигенсвязывающий фрагмент» означает молекулу, отличную от интактного антитела, которая содержит часть интактного антитела, связывающую антиген, который связывает интактное антитело. Примеры фрагментов антител включают, но не ограничиваются ими, Fv, Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')<sub>2</sub>; димера; линейные антитела; переменные области тяжелой цепи (V<sub>H</sub>), одноцепочечные молекулы антител, такие как scFv, и однодоменные антитела, содержащие только область V<sub>H</sub>; а также мультиспецифические антитела, образованные из фрагментов антител. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен в предложенном CAR представляет собой или включает фрагмент антитела, содержащий переменную область тяжелой цепи (V<sub>H</sub>) и переменную область легкой цепи (V<sub>L</sub>). В конкретных вариантах осуществления антитела представляют собой одноцепочечные фрагменты антител, содержащие переменную область тяжелой цепи (V<sub>H</sub>) и/или переменную область легкой цепи (V<sub>L</sub>), такие как scFv.

[0406] В некоторых вариантах осуществления scFv получен из FMC63. FMC63 представляет собой мышинное моноклональное IgG1 антитело, полученное против клеток Nalm-1 и -16, экспрессирующих CD19 человека (Ling, N. R., et al. (1987). *Leucocyte typing III*. 302). В некоторых вариантах осуществления антитело FMC63 содержит CDRH1 и H2 с последовательностями SEQ ID NO: 39 и 40, соответственно, CDRH3 с последовательностью SEQ ID NO: 41 или 55, CDRL1 с последовательностью SEQ ID NO: 36, CDR L2 с последовательностью SEQ ID NO: 37 или 56 и CDR L3 с последовательностью SEQ ID NO: 38 или 35. В некоторых вариантах осуществления антитело FMC63 содержит переменную область тяжелой цепи (V<sub>H</sub>), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 42, и переменную область легкой цепи (V<sub>L</sub>), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 43.

[0407] В некоторых вариантах осуществления svFv содержит переменную область легкой цепи, содержащую CDRL1 с последовательностью SEQ ID NO: 36, CDRL2 с последовательностью SEQ ID NO: 37 и CDRL3 с последовательностью SEQ ID NO: 38, и/или переменную область тяжелой цепи, содержащую CDRH1 с последовательностью SEQ ID NO: 39, CDRH2 с последовательностью SEQ ID NO: 40 и CDRH3 с последовательностью SEQ ID NO: 41. В некоторых вариантах осуществления scFv содержит переменную область тяжелой цепи с последовательностью SEQ ID NO: 42 и переменную область легкой цепи с последовательностью SEQ ID NO: 43. В некоторых вариантах осуществления переменная область тяжелой цепи и переменная область легкой цепи связаны линкером. В некоторых вариантах осуществления линкер имеет последовательность SEQ ID NO: 57. В некоторых вариантах осуществления scFv содержит, в следующем порядке, V<sub>H</sub>, линкер и V<sub>L</sub>. В некоторых вариантах осуществления scFv содержит, в следующем порядке, V<sub>L</sub>, линкер и V<sub>H</sub>. В некоторых вариантах осуществления scFv закодирован нуклеотидной последовательностью, приведенной в SEQ ID NO: 58, или последовательностью, которая имеет 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: 58. В некоторых вариантах осуществления scFv содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 44, или последовательность, которая имеет 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: 44.

[0408] В некоторых вариантах осуществления scFv получен из SJ25C1. SJ25C1 представляет собой мышинное моноклональное IgG1 антитело, полученное против клеток Nalm-1 и -16, экспрессирующих CD19 человека (Ling, N. R., et al. (1987). Leucocyte typing III. 302). В некоторых вариантах осуществления антитело SJ25C1 содержит CDRH1, H2 и H3 с последовательностями SEQ ID NO: 48-50, соответственно, и CDRL1, L2 и L3 с последовательностями, приведенными в SEQ ID NO: 45-47, соответственно. В некоторых вариантах осуществления антитело SJ25C1 содержит переменную область тяжелой цепи ( $V_H$ ), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 51, и переменную область легкой цепи ( $V_L$ ), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 52.

[0409] В некоторых вариантах осуществления scFv содержит переменную область легкой цепи, содержащую CDRL1 с последовательностью SEQ ID NO: 45, CDRL2 с последовательностью SEQ ID NO: 46 и CDRL3 с последовательностью SEQ ID NO: 47, и/или переменную область тяжелой цепи, содержащую CDRH1 с последовательностью SEQ ID NO: 48, CDRH2 с последовательностью SEQ ID NO: 49 и CDRH3 с последовательностью SEQ ID NO: 50. В некоторых вариантах осуществления scFv содержит переменную область тяжелой цепи с последовательностью SEQ ID NO: 51 и переменную область легкой цепи с последовательностью SEQ ID NO: 52. В некоторых вариантах осуществления переменная область тяжелой цепи и переменная область легкой цепи связаны линкером. В некоторых вариантах осуществления линкер имеет последовательность SEQ ID NO: 53. В некоторых вариантах осуществления scFv содержит, в следующем порядке,  $V_H$ , линкер и  $V_L$ . В некоторых вариантах осуществления scFv содержит, в следующем порядке,  $V_L$ , линкер и  $V_H$ . В некоторых вариантах осуществления scFv содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 54, или последовательность, которая имеет 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: 54.

[0410] В некоторых вариантах осуществления антиген антигенсвязывающего домена представляет собой ВСМА. В некоторых вариантах осуществления scFv содержит  $V_H$  и  $V_L$ , полученные из антитела, или фрагмента антитела, специфического для ВСМА. В некоторых вариантах осуществления антитело, или фрагмент антитела, которое связывает ВСМА, представляет собой или включает  $V_H$  и  $V_L$  из антитела, или фрагмента антитела, описанного в публикациях международных патентных заявок с номерами WO 2016/090327 и WO 2016/090320.

[0411] В некоторых вариантах осуществления антиген антигенсвязывающего

домена представляет собой GPRC5D. В некоторых вариантах осуществления scFv содержит VH и VL, полученные из антитела, или фрагмента антитела, специфического для GPRC5D. В некоторых вариантах осуществления антитело, или фрагмент антитела, которое связывает GPRC5D, представляет собой или включает VH и VL из антитела, или фрагмента антитела, описанного в публикациях международных патентных заявок с номерами WO 2016/090329 и WO 2016/090312.

[0412] В некоторых вариантах осуществления антиген представляет собой CD20. В некоторых вариантах осуществления scFv содержит VH и VL, полученные из антитела, или фрагмента антитела, специфического для CD20. В некоторых вариантах осуществления антитело, или фрагмент антитела, которое связывает CD20, представляет собой антитело, которое представляет собой или получено из ритуксимаба, такое как scFv ритуксимаба.

[0413] В некоторых вариантах осуществления антиген представляет собой CD22. В некоторых вариантах осуществления scFv содержит VH и VL, полученные из антитела, или фрагмента антитела, специфического для CD22. В некоторых вариантах осуществления антитело, или фрагмент антитела, которое связывает CD22, представляет собой антитело, которое представляет собой или получено из m971, такое как scFv m971.

[0414] В некоторых вариантах осуществления химерный антигенный рецептор содержит внеклеточный фрагмент, содержащий антитело или фрагмент антитела. В некоторых аспектах химерный антигенный рецептор содержит внеклеточный фрагмент, содержащий антитело или фрагмент антитела, и внутриклеточный сигнальный домен. В некоторых вариантах осуществления антитело или фрагмент включает scFv.

[0415] В некоторых вариантах осуществления фрагмент антитела рекомбинантного рецептора, например, CAR, также содержит 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 ее часть, происходит из IgG человека, например, IgG4 или IgG1. В некоторых аспектах часть константной области служит в качестве спейсерной области между узнающим антиген компонентом, например, scFv, и трансмембранным доменом. Спейсер может иметь длину, обеспечивающую повышенную отзывчивость клетки после связывания антигена, в сравнении с отсутствием спейсера. Иллюстративные спейсеры включают, но без ограничения, те, которые описаны в Hudecek et al. (2013) Clin. Cancer Res., 19:3153, публикации международной патентной заявки с номером WO2014031687, патенте США № 8822647 или опубликованной патентной заявке с номером US2014/0271635.

[0416] В некоторых вариантах осуществления константная область, или ее часть, происходит из IgG человека, например, IgG4 или IgG1. В некоторых вариантах осуществления спейсер имеет последовательность ESKYGPPCPPCP (приведенную в SEQ ID NO: 1) и закодирован последовательностью, приведенной в SEQ ID NO: 2. В некоторых вариантах осуществления спейсер имеет последовательность, приведенную в SEQ ID NO:

3. В некоторых вариантах осуществления спейсер имеет последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 4. В некоторых вариантах осуществления константная область, или ее часть, происходит из IgD. В некоторых вариантах осуществления спейсер имеет последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах осуществления спейсер имеет аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, или более, идентичность последовательности с любой из SEQ ID NO: 1, 3, 4 или 5. В некоторых вариантах осуществления спейсер имеет последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 25-33. В некоторых вариантах осуществления спейсер имеет аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, или более, идентичность последовательности с любой из SEQ ID NO: 25-33.

[0417] В некоторых вариантах осуществления антигенный рецептор содержит внутриклеточный домен, связанный непосредственно или опосредованно с внеклеточным доменом. В некоторых вариантах осуществления химерный антигенный рецептор содержит трансмембранный домен, связывающий внеклеточный домен и внутриклеточный сигнальный домен. В некоторых вариантах осуществления внутриклеточный сигнальный домен включает ITAM. Например, в некоторых аспектах узнающий антиген домен (например, внеклеточный домен), как правило, связан с одним или более внутриклеточными сигнальными компонентами, такими как сигнальные компоненты, которые имитируют активацию через антигенный рецепторный комплекс, такой как комплекс TCR, в случае CAR, и/или сигнал через другой поверхностный рецептор. В некоторых вариантах осуществления химерный рецептор содержит 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.

[0418] В одном варианте осуществления используют трансмембранный домен, который естественным образом связан с одним из доменов в рецепторе, например, CAR. В некоторых случаях трансмембранный домен выбирают, или модифицируют путем замены аминокислот, чтобы избежать связывания таких доменов с трансмембранными доменами тех же самых, или иных, поверхностных мембранных белков для минимизации взаимодействий с другими составляющими рецепторного комплекса.

[0419] В некоторых вариантах осуществления трансмембранный домен получают из естественного или из синтетического источника. В некоторых аспектах, если источник является естественным, домен происходит из любого связанного с мембраной или трансмембранного белка. Трансмембранные области включают те, которые получены из (то есть, содержат 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. Альтернативно, в

некоторых вариантах осуществления трансмембранный домен является синтетическим. В некоторых аспектах синтетический трансмембранный домен преимущественно содержит гидрофобные остатки, такие как лейцин и валин. В некоторых аспектах триплет фенилаланин, триптофан и валин будет присутствовать на каждом конце синтетического трансмембранного домена. В некоторых вариантах осуществления связь осуществляется через линкеры, спейсеры и/или трансмембранный домен(ы). В некоторых аспектах трансмембранный домен содержит трансмембранный фрагмент CD28.

[0420] В некоторых вариантах осуществления внеклеточный домен и трансмембранный домен могут быть связаны непосредственно или опосредованно. В некоторых вариантах осуществления внеклеточный домен и трансмембранный домен связаны спейсером, таким как любой из спейсеров, описанных в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления рецептор содержит внеклеточный фрагмент молекулы, из которой получен трансмембранный домен, например, внеклеточный фрагмент CD28.

[0421] В число внутриклеточных сигнальных областей входят те, которые имитируют или аппроксимируют сигнал через естественный антигенный рецептор, сигнал через такой рецептор в сочетании с костимулирующим рецептором и/или сигнал только через костимулирующий рецептор. В некоторых вариантах осуществления имеется короткий олиго- или полипептидный линкер, например, линкер длиной от 2 до 10 аминокислот, например, линкер, содержащий остатки глицина и серина, например, дуплет глицин-серин, который является связывающим звеном между трансмембранным доменом и цитоплазматическим сигнальным доменом CAR.

[0422] В некоторых аспектах описано, что Т-клеточная активация опосредуется цитоплазматическими сигнальными последовательностями двух видов: теми, которые инициируют антиген-зависимую основную активацию через TCR (основные цитоплазматические сигнальные последовательности), и теми, которые действуют независимо от антигена образом, обеспечивая вспомогательный или костимулирующий сигнал (вспомогательные цитоплазматические сигнальные последовательности). В некоторых аспектах CAR содержит один или оба из таких сигнальных компонентов.

[0423] Рецептор, например, CAR, как правило, содержит по меньшей мере один внутриклеточный сигнальный компонент, или компоненты. В некоторых аспектах CAR содержит основную цитоплазматическую сигнальную последовательность, которая регулирует основную активацию комплекса TCR. Основные цитоплазматические сигнальные последовательности, которые действуют стимулирующим образом, могут содержать сигнальные мотивы, которые известны как иммунорецепторные тирозиновые активирующие мотивы, или ITAM. Примеры ITAM-содержащих основных цитоплазматических сигнальных последовательностей включают те, которые получены из CD3-дзета цепи, FcR-гамма, CD3-гамма, CD3-дельта и CD3-эпсилон. В некоторых вариантах осуществления цитоплазматическая сигнальная молекула(ы) в CAR содержит(ат) цитоплазматический сигнальный домен, его часть или последовательность



из CD3-дзета.

[0424] В некоторых вариантах осуществления рецептор содержит внутриклеточный компонент комплекса TCR, такой как цепь CD3 TCR, который опосредует T-клеточную активацию и цитотоксичность, например, дзета-цепь CD3. Таким образом, в некоторых аспектах антигенсвязывающий фрагмент связан 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, также содержит часть одной или более дополнительных молекул, таких как Fc-рецептор  $\gamma$ , CD8, CD4, CD25 или CD16. Например, в некоторых аспектах CAR содержит химерную молекулу из CD3-дзета (CD3- $\zeta$ ) или Fc-рецептора  $\gamma$  и CD8, CD4, CD25 или CD16.

[0425] В некоторых вариантах осуществления после связывания CAR или другого химерного рецептора цитоплазматический домен или внутриклеточный сигнальный домен рецептора активирует по меньшей мере одну из нормальных эффекторных функций, или ответов, иммунной клетки, например, T-клетки, генетически модифицированной для экспрессии CAR. Например, в некоторых контекстах CAR индуцирует такую функцию T-клетки, как цитолитическая активность или T-хелперная активность, например, секрецию цитокинов или других факторов. В некоторых вариантах осуществления используют укороченный фрагмент компонента внутриклеточного сигнального домена антигенного рецептора или костимулирующей молекулы вместо интактной иммуностимулирующей цепи, например, если он передает сигнал эффекторной функции. В некоторых вариантах осуществления внутриклеточный сигнальный домен или домены содержат цитоплазматические последовательности T-клеточного рецептора (TCR), и в некоторых аспектах также цитоплазматические последовательности корецепторов, которые в естественном контексте действуют согласованно с таким рецептором, иницируя передачу сигнала после связывания антигенного рецептора.

[0426] В контексте естественного TCR для полной активации, как правило, требуется не только сигнализация через TCR, но также и костимулирующий сигнал. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления для стимуляции полной активации в CAR также включают компонент для генерирования вспомогательного или костимулирующего сигнала. В других вариантах осуществления CAR не содержит компонент для генерирования костимулирующего сигнала. В некоторых аспектах дополнительный CAR экспрессируется в той же клетке и обеспечивает компонент для генерирования вспомогательного или костимулирующего сигнала.

[0427] В некоторых вариантах осуществления химерный антигенный рецептор содержит внутриклеточный домен T-клеточной костимулирующей молекулы. В некоторых вариантах осуществления CAR содержит сигнальный домен и/или трансмембранный фрагмент костимулирующего рецептора, например CD28, 4-1BB, OX40, DAP10 и ICOS. В некоторых аспектах один и тот же CAR содержит как

активирующие, так и костимулирующие компоненты. В некоторых вариантах осуществления химерный антигенный рецептор содержит внутриклеточный домен 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.

[0428] В некоторых вариантах осуществления активирующий домен включен в один CAR, в то время как костимулирующий компонент предоставляет другой CAR, узнающий другой антиген. В некоторых вариантах осуществления CAR включают активирующие или стимулирующие CAR, костимулирующие CAR, оба экспрессируемые на одной и той же клетке (смотри WO2014/055668). В некоторых аспектах клетки содержат один или более стимулирующих или активирующих CAR и/или костимулирующих CAR. В некоторых вариантах осуществления клетки также содержат ингибирующий CAR (iCAR, смотри Fedorov et al., *Sci. Transl. Medicine*, 5(215) (December, 2013), такой как CAR, узнающий антиген, отличный от антигена, связанного с, и/или специфического для заболевания или состояния, в результате чего активирующий сигнал, доставляемый через CAR, нацеленный на связанную с заболеванием мишень, уменьшается или ингибируется за счет связывания ингибирующего CAR с его лигандом, например, для уменьшения нецелевых эффектов.

[0429] В некоторых вариантах осуществления два рецептора индуцируют, соответственно, активирующий и ингибирующий сигнал в клетке, так что связывание одного рецептора с его антигеном активирует клетку или индуцирует ответ, но связывание второго ингибирующего рецептора с его антигеном индуцирует сигнал, который подавляет или гасит этот ответ. Примерами являются сочетания активирующего CAR и ингибирующего CAR (iCAR). Такую стратегию можно использовать, 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, и ингибирующий рецептор связывает отдельный антиген, который экспрессируется на нормальных клетках, но не клетках, связанных с заболеванием или состоянием.

[0430] В некоторых аспектах химерный рецептор представляет собой или включает ингибирующий CAR (например, iCAR) и включает внутриклеточные компоненты, которые гасят или подавляют иммунный ответ, такой как стимулируемый ИТAM и/или костимулирующей молекулой ответ в клетке. Примерами таких внутриклеточных сигнальных компонентов являются компоненты, встречающиеся на молекулах иммунных контрольных точек, включая PD-1, CTLA4, LAG3, BTLA, OX2R, TIM-3, TIGIT, LAIR-1, PGE2 рецепторы EP2/4, рецепторы аденозина, включая A2AR. В некоторых аспектах генетически модифицированная клетка содержит ингибирующий CAR, содержащий сигнальный домен такой ингибирующей молекулы, или полученный из такой ингибирующей молекулы, который служит для подавления ответа клетки, например,

индуцированного активирующим и/или костимулирующим CAR.

[0431] В конкретных вариантах осуществления внутриклеточный сигнальный домен содержит трансмембранный и сигнальный домен CD28, связанные с внутриклеточным доменом CD3 (например, CD3-дзета). В некоторых вариантах осуществления внутриклеточный сигнальный домен содержит химерные костимулирующие домены CD28 и CD137 (4-1BB, TNFRF9), связанные с внутриклеточным доменом CD3-дзета.

[0432] В некоторых вариантах осуществления CAR содержит один или более, например, два или более, костимулирующих доменов и активирующий домен, например, основной активирующий домен, в цитоплазматическом фрагменте. Иллюстративные CAR содержат внутриклеточные компоненты CD3-дзета, CD28 и 4-1BB.

[0433] В некоторых вариантах осуществления антигенный рецептор также содержит маркер, и/или клетки, экспрессирующие CAR или другой антигенный рецептор, также содержат суррогатный маркер, такой как клеточный поверхностный маркер, который может быть использован для подтверждения трансдукции или генетической модификации клетки для экспрессии рецептора. В некоторых аспектах маркер включает весь, или частично (например, укороченную форму), CD34, NGFR или рецептор эпидермального фактора роста, например, укороченный вариант такого клеточного поверхностного рецептора (например, tEGFR). В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота, кодирующая маркер, функционально связана с полинуклеотидом, кодирующим последовательность линкера, например, последовательность расщепляемого линкера, например, T2A. Например, маркер и, необязательно, последовательность линкера, могут представлять собой любые из описанных в опубликованной патентной заявке № WO2014031687. Например, маркер может представлять собой укороченный EGFR (tEGFR), который, необязательно, связан с последовательностью линкера, например, последовательностью расщепляемого линкера T2A.

[0434] Иллюстративный полипептид укороченного EGFR (например, tEGFR) содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 7 или 16, или аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, или более, идентичность последовательности с SEQ ID NO: 7 или 16. Иллюстративная последовательность линкера T2A содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 6 или 17, или аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, или более, идентичность последовательности с SEQ ID NO: 6 или 17.

[0435] В некоторых вариантах осуществления маркер представляет собой молекулу, например, клеточный поверхностный белок, обычно не присутствующий на Т-клетках, или обычно не присутствующий на поверхности Т-клеток, или его часть. В некоторых вариантах осуществления молекула является не собственной молекулой, например, не собственным белком, то есть, молекулой, которая не узнается, как

«собственная», иммунной системой хозяина, которому клетки будут адоптивно перенесены.

[0436] В некоторых вариантах осуществления маркер не имеет терапевтическую функцию и/или не производит какой-либо эффект, а используется лишь в качестве маркера для генетической модификации, например, для селекции успешно генетически модифицированных клеток. В других вариантах осуществления маркер может представлять собой терапевтическую молекулу или молекулу, иным образом производящую нужный эффект, например, лиганд для клетки, которая будет встречаться *in vivo*, например, костимулирующую молекулу или молекулу иммунной контрольной точки для усиления и/или подавления ответов клеток после адоптивного переноса и встречи с лигандом.

[0437] В некоторых случаях CAR называют CAR первого, второго и/или третьего поколения. В некоторых аспектах CAR первого поколения представляет собой CAR, который при связывании антигена обеспечивает исключительно индуцированный цепью CD3 сигнал; в некоторых аспектах CAR второго поколения представляет собой CAR, который обеспечивает такой сигнал и костимулирующий сигнал, например, CAR, содержащий внутриклеточный сигнальный домен из костимулирующего рецептора, такого как CD28 или CD137; в некоторых аспектах CAR третьего поколения представляет собой CAR, который содержит несколько костимулирующих доменов из разных костимулирующих рецепторов.

[0438] Например, в некоторых вариантах осуществления CAR содержит антитело, например, фрагмент антитела, такой как scFv, специфическое для антигена, включая любой из описанных, трансмембранный домен, который представляет собой или содержит трансмембранный фрагмент CD28, или его функциональный вариант, и внутриклеточный сигнальный домен, содержащий сигнальный фрагмент CD28, или его функциональный вариант, и сигнальный фрагмент CD3-дзета, или его функциональный вариант. В некоторых вариантах осуществления CAR содержит антитело, например, фрагмент антитела, такой как scFv, специфическое для антигена, включая любой из описанных, трансмембранный домен, который представляет собой или содержит трансмембранный фрагмент CD28, или его функциональный вариант, и внутриклеточный сигнальный домен, содержащий сигнальный фрагмент 4-1BB, или его функциональный вариант, и сигнальный фрагмент CD3-дзета, или его функциональный вариант. В некоторых таких вариантах осуществления рецептор также содержит спейсер, содержащий часть молекулы Ig, такой как молекула Ig человека, например, шарнир Ig, например, шарнир IgG4, например, спейсер, содержащий только шарнир.

[0439] В некоторых вариантах осуществления трансмембранный домен рекомбинантного рецептора, например, CAR, представляет собой или включает трансмембранный домен CD28 человека (например, регистрационный № P01747.1), или его вариант, например, трансмембранный домен, содержащий аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 8, или аминокислотную

последовательность, которая имеет по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, или более, идентичность последовательности с SEQ ID NO: 8; в некоторых вариантах осуществления содержащий трансмембранный домен фрагмент рекомбинантного рецептора содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 9, или аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере или примерно 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, или более, идентичность последовательности с ней.

[0440] В некоторых вариантах осуществления внутриклеточный сигнальный компонент(ы) рекомбинантного рецептора, например, CAR, содержит внутриклеточный костимулирующий сигнальный домен CD28 человека, или его функциональный вариант или фрагмент, например, домен с заменой LL на GG в положениях 186-187 природного белка CD28. Например, внутриклеточный сигнальный домен может содержать аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 10 или 11, или аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, или более, идентичность последовательности с SEQ ID NO: 10 или 11. В некоторых вариантах осуществления внутриклеточный домен содержит внутриклеточный костимулирующий сигнальный домен 4-1BB (например, регистрационный № Q07011.1), или его функциональный вариант или фрагмент, например, аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 12, или аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, или более, идентичность последовательности с SEQ ID NO: 12.

[0441] В некоторых вариантах осуществления внутриклеточный сигнальный домен рекомбинантного рецептора, например, CAR, содержит стимулирующий сигнальный домен CD3-дзета человека, или его функциональный вариант, например, 112-ак цитоплазматический домен изоформы 3 CD3ζ человека (регистрационный № P20963.2), или сигнальный домен CD3-дзета, описанный в патенте США № 7446190 или патенте США № 8911993. Например, в некоторых вариантах осуществления внутриклеточный сигнальный домен содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 13, 14 или 15, или аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, или более, идентичность последовательности с SEQ ID NO: 13, 14 или 15.

[0442] В некоторых аспектах спейсер содержит только шарнирную область IgG, например, только шарнир IgG4 или IgG1, например, содержащий только шарнир спейсер с последовательностью SEQ ID NO: 1. В других вариантах осуществления спейсер представляет собой или содержит шарнир Ig, например, шарнир из IgG4, необязательно, связанный с доменами CH2 и/или CH3. В некоторых вариантах осуществления спейсер представляет собой шарнир Ig, например, шарнир IgG4, связанный с доменами CH2 и CH3, с последовательностью SEQ ID NO: 4. В некоторых вариантах осуществления

спейсер представляет собой шарнир Ig, например, шарнир IgG4, связанный только с доменом CH3, например, с последовательностью SEQ ID NO: 3. В некоторых вариантах осуществления спейсер представляет собой или включает богатую остатками глицина и серина последовательность, или другой гибкий линкер, такой как известные гибкие линкеры.

[0443] Например, в некоторых вариантах осуществления CAR содержит антитело, например, фрагмент антитела, включая scFv, спейсер, такой как спейсер, содержащий фрагмент молекулы иммуноглобулина, например, шарнирную область и/или одну или более константных областей молекулы тяжелой цепи, например, содержащий шарнир Ig спейсер, трансмембранный домен, содержащий весь, или частично, трансмембранный домен из CD28, внутриклеточный сигнальный домен из CD28 и сигнальный домен CD3-дзета. В некоторых вариантах осуществления CAR содержит антитело или фрагмент, такой как scFv, спейсер, например, любой из содержащих шарнир Ig спейсеров, трансмембранный домен из CD28, внутриклеточный сигнальный домен из 4-1BB и сигнальный домен из CD3-дзета.

[0444] Иллюстративные суррогатные маркеры могут включать укороченные формы полипептидов клеточной поверхности, например, укороченные формы, которые являются нефункциональными и не передают, или не способны передавать, сигнал, или сигнал, обычно передаваемый полноразмерной формой полипептида клеточной поверхности, и/или не подвергаются, или не способны подвергаться, интернализации. Иллюстративные укороченные полипептиды клеточной поверхности включают укороченные формы рецепторов факторов роста или других рецепторов, такие как укороченный рецептор 2 человеческого эпидермального фактора роста (tHER2), укороченный рецептор эпидермального фактора роста (tEGFR, иллюстративная последовательность tEGFR приведена в SEQ ID NO: 7 или 16) или простатический специфический мембранный антиген (PSMA), или его модифицированная форма. tEGFR может содержать эпитоп, узнаваемый антителом цетуксимабом (эрбитукс<sup>®</sup>) или другим терапевтическим анти-EGFR антителом, или связывающей молекулой, который может быть использован для идентификации или селекции клеток, генетически модифицированных конструктом tEGFR и закодированным экзогенным белком, и/или для элиминации или отделения клеток, экспрессирующих закодированный экзогенный белок. Смотри патент США № 8802374 и публикацию Liu et al., Nature Biotech. 2016 April; 34(4): 430-434). В некоторых аспектах маркер, например, суррогатный маркер, содержит весь или часть (например, укороченную форму) CD34, NGFR, CD19, или укороченный CD19, например, укороченный не принадлежащий человеку CD19, или рецептор эпидермального фактора роста (например, tEGFR). В некоторых вариантах осуществления маркер представляет собой или включает флуоресцентный белок, например, зеленый флуоресцентный белок (GFP), усиленный зеленый флуоресцентный белок (EGFP), такой как суперсворачиваемый GFP (sfGFP), красный флуоресцентный белок (RFP), такой как tdTomato, mCherry, mStrawberry, AsRed2, DsRed или DsRed2, голубой флуоресцентный белок (CFP), сине-

зеленый флуоресцентный белок (BFP), усиленный синий флуоресцентный белок (EBFP) и желтый флуоресцентный белок (YFP), а также их варианты, включая видовые варианты, мономерные варианты и кодон-оптимизированные и/или усиленные варианты флуоресцентных белков. В некоторых вариантах осуществления маркер представляет собой или включает фермент, такой как люцифераза, ген *lacZ* из *E. coli*, щелочная фосфатаза, секретируемая эмбриональная щелочная фосфатаза (SEAP), хлорамфеникол-ацетилтрансфераза (CAT). Иллюстративные светоизлучающие репортерные белки включают люциферазу (*luc*),  $\beta$ -галактозидазу, хлорамфеникол-ацетилтрансферазу (CAT),  $\beta$ -глюкуронидазу (GUS) или их варианты.

[0445] В некоторых вариантах осуществления маркер представляет собой селективный маркер. В некоторых вариантах осуществления селективный маркер представляет собой или включает полипептид, придающий устойчивость к экзогенным средствам или лекарственным средствам. В некоторых вариантах осуществления селективный маркер представляет собой ген устойчивости к антибиотику. В некоторых вариантах осуществления селективный маркер, представляющий собой ген устойчивости к антибиотику, придает устойчивость к антибиотику 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 его модифицированную форму.

[0446] В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота, кодирующая маркер, функционально связана с полинуклеотидом, кодирующим последовательность линкера, например, последовательность расщепляемого линкера, например, T2A. Например, маркер и, необязательно, последовательность линкера, могут быть любыми из тех, которые описаны в РСТ публикации № WO2014031687.

[0447] В некоторых вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая такие конструкции CAR, также содержит последовательность, кодирующую элемент проскока рибосомы T2A и/или последовательность tEGFR, например, далее по ходу транскрипции от последовательности, кодирующей CAR. В некоторых вариантах осуществления последовательность кодирует элемент проскока рибосомы T2A с последовательностью SEQ ID NO: 6 или 17, или аминокислотной последовательностью, которая имеет по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, или более, идентичность последовательности с SEQ ID NO: 6 или 17. В некоторых вариантах осуществления Т-клетки, экспрессирующие антигенный рецептор (например, CAR), также могут быть созданы для экспрессии укороченного EGFR (EGFRt) в качестве не иммуногенного селективного эпитопа (например, путем введения конструкта, кодирующего CAR и EGFRt, разделенные элементом проскока рибосомы T2A, для экспрессии двух белков с одного и того же конструкта), который затем может быть использован в качестве маркера для обнаружения таких клеток (смотри, например, патент США № 8802374). В некоторых вариантах осуществления

последовательность кодирует последовательность tEGFR, приведенную в SEQ ID NO: 7 или 16, или аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, или более, идентичность последовательности с SEQ ID NO: 7 или 16. В некоторых случаях пептид, такой как T2A, может вызывать пропуск рибосомой (проскок рибосомы) синтеза пептидной связи на С-конце элемента 2A, что приводит к разделению между концом последовательности 2A и следующим далее по ходу транскрипции пептидом (смотри, например, de Felipe. *Genetic Vaccines and Ther.* 2:13 (2004) и de Felipe et al. *Traffic* 5:616-626 (2004)). Известны различные элементы 2A. Примеры последовательностей 2A, которые могут быть использованы в способах и нуклеиновых кислотах, раскрытых в настоящем документе, включают, без ограничения, последовательности 2A из вируса ящура (F2A, например, SEQ ID NO: 21), вируса ринита А лошадей (E2A, например, SEQ ID NO: 20), вируса *Thosea asigna* (T2A, например, SEQ ID NO: 6 или 17) и тешовируса-1 свиней (P2A, например, SEQ ID NO: 18 или 19), как описано в публикации патента США № 20070116690.

[0448] В некоторых случаях нуклеотидная последовательность, кодирующая рекомбинантный рецептор, например, химерный антигенный рецептор (CAR), содержит сигнальную последовательность, которая кодирует сигнальный пептид. Неограничивающие иллюстративные примеры сигнальных пептидов включают, например, сигнальный пептид альфа-цепи GMCSFR с последовательностью SEQ ID NO: 62, закодированной нуклеотидной последовательностью, приведенной в SEQ ID NO: 61, сигнальный пептид альфа-цепи CD8 с последовательностью SEQ ID NO: 60 или сигнальный пептид CD33 с последовательностью SEQ ID NO: 59.

[0449] Рекомбинантные рецепторы, такие как CAR, экспрессируемые клетками, введенными субъекту, как правило, узнают или специфически связывают молекулу, которая экспрессируется при, связана с и/или характерна для подвергаемого лечению заболевания или состояния, или связанных с ним клеток. После специфического связывания с молекулой, например, антигеном, рецептор, как правило, доставляет иммуностимулирующий сигнал, например, передаваемый ИТАМ сигнал, в клетку, тем самым стимулируя иммунный ответ, направленный на клетки, связанные с заболеванием или состоянием. Например, в некоторых вариантах осуществления клетки экспрессируют CAR, который специфически связывает антиген, экспрессируемый клеткой или тканью, характерной для заболевания или состояния, или связанной с заболеванием или состоянием.

## **B. TCR**

[0450] В некоторых вариантах осуществления предложены генетически модифицированные клетки, такие как Т-клетки, экспрессирующие Т-клеточный рецептор (TCR), или его антигенсвязывающий фрагмент, который узнает пептидный эпитоп или Т-клеточный эпитоп полипептида-мишени, такого как антиген опухолевого, вирусного или аутоиммунного белка.



[0451] В некоторых вариантах осуществления «Т-клеточный рецептор», или «TCR», представляет собой молекулу, содержащую переменные цепи  $\alpha$  и  $\beta$  (также известные как TCR $\alpha$  и TCR $\beta$ , соответственно) или переменные цепи  $\gamma$  и  $\delta$  (также известные как TCR $\gamma$  и TCR $\delta$ , соответственно), или их антигенсвязывающие фрагменты, которая способна к специфическому связыванию с пептидом, связанным с молекулой МНС. В некоторых вариантах осуществления TCR имеет форму  $\alpha\beta$ . Как правило, TCR, существующие в формах  $\alpha\beta$  и  $\gamma\delta$ , в целом, имеют аналогичную структуру, но экспрессирующие их Т-клетки могут иметь отличающееся анатомическое расположение или разные функции. TCR встречается на поверхности клеток или в растворимой форме. Как правило, TCR встречается на поверхности Т-клеток (или Т-лимфоцитов), где он обычно отвечает за узнавание антигенов, связанных с молекулами главного комплекса гистосовместимости (МНС).

[0452] Если нет иных указаний, термин «TCR» должен охватывать полноразмерные TCR, а также их антигенсвязывающие фрагменты или антигенсвязывающие части. В некоторых вариантах осуществления TCR является интактным или полноразмерным TCR, включая TCR в форме  $\alpha\beta$  или форме  $\gamma\delta$ . В некоторых вариантах осуществления TCR представляет собой антигенсвязывающий фрагмент, который меньше, чем полноразмерный TCR, но который связывает конкретный пептид, связанный с молекулой МНС, например, связывает комплекс МНС-пептид. В некоторых случаях антигенсвязывающий фрагмент, или часть TCR, может содержать лишь часть структурных доменов полноразмерного или интактного TCR, но все еще способен связывать пептидный эпитоп, например, комплекс МНС-пептид, который связывает полноразмерный TCR. В некоторых случаях антигенсвязывающий фрагмент содержит переменные домены TCR, например, переменную  $\alpha$ -цепь и переменную  $\beta$ -цепь TCR, достаточные для образования связывающего сайта для связывания специфического комплекса МНС-пептид. Как правило, переменные цепи TCR содержат определяющие комплементарность области, участвующие в узнавании пептида, МНС и/или комплекса МНС-пептид.

[0453] В некоторых вариантах осуществления переменные домены TCR содержат гиперпеременные петли, или определяющие комплементарность области (CDR), которые, как правило, играют главную роль в узнавании и связывании, а также специфичности в отношении, антигена. В некоторых вариантах осуществления CDR в TCR, или их сочетания, образуют все, или практически все, из антигенсвязывающих сайтов конкретной молекулы TCR. Различные CDR в переменной области цепи TCR обычно разделены каркасными областями (FR), которые, в целом, имеют меньшую переменность среди молекул TCR в сравнении с CDR (смотри, например, Jorges et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. U.S.A. 87:9138, 1990; Chothia et al., EMBO J. 7:3745, 1988; смотри также Lefranc et al., Dev. Comp. Immunol. 27:55, 2003). В некоторых вариантах осуществления CDR3 является основной CDR, ответственной за связывание антигена или специфичность, или является наиболее важной среди трех CDR в переменной области

конкретного TCR для узнавания антигена и/или для взаимодействия с процессированной пептидной частью комплекса пептид-МНС. В некоторых контекстах CDR1 альфа-цепи может взаимодействовать с N-концевой частью определенных антигенных пептидов. В некоторых контекстах CDR1 бета-цепи может взаимодействовать с C-концевой частью пептида. В некоторых контекстах CDR2 вносит наибольший вклад, или является основной CDR, ответственной за взаимодействие с, или узнавание МНС-части комплекса МНС-пептид. В некоторых вариантах осуществления вариабельная область  $\beta$ -цепи может содержать дополнительную гипервариабельную область (CDR4 или HVR4), которая, как правило, участвует в связывании суперантигена, но не в узнавании антигена (Kotb (1995) *Clinical Microbiology Reviews*, 8:411-426).

[0454] В некоторых вариантах осуществления TCR также может содержать константный домен, трансмембранный домен и/или короткий цитоплазматический «хвост» (смотри, например, Janeway et al., *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease*, 3rd Ed., Current Biology Publications, p. 4:33, 1997). В некоторых аспектах такая цепь TCR может иметь один N-концевой вариабельный домен иммуноглобулина, один константный домен иммуноглобулина, трансмембранную область и короткий цитоплазматический «хвост» на C-конце. В некоторых вариантах осуществления TCR связан с инвариантными белками комплекса CD3, вовлеченными в медиацию передачи сигнала.

[0455] В некоторых вариантах осуществления цепь TCR содержит один или более константных доменов. Например, внеклеточный фрагмент конкретной цепи TCR (например,  $\alpha$ -цепи или  $\beta$ -цепи) может содержать два иммуноглобулин-подобных домена, таких как вариабельные домены (например,  $V\alpha$  или  $V\beta$ ; как правило, аминокислоты 1-116 по системе нумерации Kabat Kabat et al., «Sequences of Proteins of Immunological Interest», US Dept. Health and Human Services, Public Health Service National Institutes of Health, 1991, 5th ed.), и константный домен (например, константный домен  $\alpha$ -цепи или  $C\alpha$ , как правило, положения 117-259 в цепи по системе нумерации Kabat или константный домен  $\beta$ -цепи, или  $C\beta$ , как правило, положения 117-295 в цепи по системе нумерации Kabat), вблизи клеточной мембраны. Например, в некоторых случаях внеклеточный фрагмент TCR, образованный двумя цепями, содержит два проксимальных по отношению к мембране константных домена и два дистальных по отношению к мембране вариабельных домена, при этом каждый из вариабельных доменов содержит области CDR. Константный домен TCR может содержать короткие соединительные последовательности, в которых остаток цистеина образует дисульфидную связь, тем самым связывая две цепи TCR. В некоторых вариантах осуществления TCR может иметь дополнительный остаток цистеина в каждой из  $\alpha$  и  $\beta$  цепей, так что TCR содержит две дисульфидные связи в константных доменах.

[0456] В некоторых вариантах осуществления цепи TCR содержат трансмембранный домен. В некоторых вариантах осуществления трансмембранный домен заряжен положительно. В некоторых случаях цепь TCR содержит цитоплазматический «хвост». В некоторых случаях структура позволяет TCR связываться с другими

молекулами, такими как CD3 и его 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, цепей CD3 $\gamma$ , CD3 $\delta$ , CD3 $\epsilon$  и CD3 $\zeta$ ) содержат один или более иммунорецепторных тирозиновых активирующих мотивов, или ITAM, которые участвуют в сигнализации комплекса TCR.

[0457] В некоторых вариантах осуществления TCR может представлять собой гетеродимер из двух цепей  $\alpha$  и  $\beta$  (или, необязательно,  $\gamma$  и  $\delta$ ) или он может представлять собой одноцепочечный конструктор TCR. В некоторых вариантах осуществления TCR представляет собой гетеродимер, содержащий две отдельные цепи (цепи  $\alpha$  и  $\beta$  или цепи  $\gamma$  и  $\delta$ ), которые связаны, например, дисульфидной связью или дисульфидными связями.

[0458] В некоторых вариантах осуществления TCR может быть получен из известной последовательности(ей) TCR, таких как последовательности цепей V $\alpha$ , $\beta$ , для которых легко доступна практически полноразмерная кодирующая последовательность. Методы получения полноразмерных последовательностей TCR, включая последовательности V-цепей, из клеточных источников хорошо известны. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновые кислоты, кодирующие TCR, могут быть получены из различных источников, например методом амплификации в полимеразной цепной реакции (ПЦР) кодирующих TCR нуклеиновых кислот, находящихся внутри, или выделенных из, конкретной клетки или клеток, или методом синтеза общеизвестных последовательностей ДНК TCR.

[0459] В некоторых вариантах осуществления TCR получают 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 *in vivo* выделенных клеток. В некоторых вариантах осуществления TCR представляет собой прошедший тимусную селекцию TCR. В некоторых вариантах осуществления TCR представляет собой неоэпитоп-рестрицированный TCR. В некоторых вариантах осуществления Т-клетки могут представлять собой культивируемую Т-клеточную гибридому или клон. В некоторых вариантах осуществления TCR или его антигенсвязывающий фрагмент, или его антигенсвязывающую часть, можно получать путем синтеза на основании информации о последовательности TCR.

[0460] В некоторых вариантах осуществления TCR получают из TCR, идентифицированного или выбранного при скрининге библиотеки TCR-кандидатов против полипептидного антигена-мишени, или его эпитопа, являющегося мишенью для Т-клеток. Библиотеки TCR могут быть получены путем амплификации репертуара V $\alpha$  и V $\beta$  из Т-клеток, полученных от субъекта, включая клетки, присутствующие в МКПК, селезенке или другом лимфоидном органе. В некоторых случаях Т-клетки могут быть размножены из опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов (ОИЛ). В некоторых вариантах

осуществления библиотеки TCR могут быть получены из CD4<sup>+</sup> или CD8<sup>+</sup> клеток. В некоторых вариантах осуществления TCR могут быть амплифицированы из T-клеточного источника от нормального или здорового субъекта, то есть библиотеки нормальных TCR. В некоторых вариантах осуществления TCR могут быть амплифицированы из T-клеточного источника от больного субъекта, то есть библиотеки связанных с заболеванием TCR. В некоторых вариантах осуществления используют вырожденные праймеры для амплификации генного репертуара V $\alpha$  и V $\beta$ , например, методом ОТ-ПЦР, в образцах, таких как T-клетки, полученные от людей. В некоторых вариантах осуществления библиотеки scTv могут быть собраны из библиотек наивных V $\alpha$  и V $\beta$ , в которых амплифицированные продукты клонируют или собирают так, чтобы они были разделены линкером. В зависимости от источника субъекта и клеток библиотеки могут быть специфическими для аллелей HLA. Альтернативно, в некоторых вариантах осуществления библиотеки TCR могут быть получены путем мутагенеза или диверсификации исходной, или каркасной, молекулы TCR. В некоторых аспектах TCR подвергают направленной эволюции, например, путем мутагенеза, например, цепи  $\alpha$  или  $\beta$ . В некоторых аспектах изменяют конкретные остатки в областях CDR TCR. В некоторых вариантах осуществления выбранный TCR может быть модифицирован методом созревания аффинности. В некоторых вариантах осуществления антиген-специфические T-клетки могут быть отобраны, например, путем скрининга для оценки активности CTL в отношении пептида. В некоторых аспектах TCR, находящийся на антиген-специфических T-клетках, может быть отобран, например, на основании активности связывания, например, конкретной аффинности или авидности для антигена.

[0461] В некоторых вариантах осуществления TCR, или его антигенсвязывающий фрагмент, представляет собой TCR, который был модифицирован или генетически модифицирован. В некоторых вариантах осуществления используют методы направленной эволюции для получения TCR с измененными свойствами, например, с более высокой аффинностью для конкретного комплекса МНС-пептид. В некоторых вариантах осуществления направленную эволюцию осуществляют методами дисплея, включая, но без ограничения, дрожжевой дисплей (Holler et al. (2003) *Nat Immunol*, 4, 55-62; Holler et al. (2000) *Proc Natl Acad Sci USA*, 97, 5387-92), фаговый дисплей (Li et al. (2005) *Nat Biotechnol*, 23, 349-54) или T-клеточный дисплей (Chervin et al. (2008) *J Immunol Methods*, 339, 175-84). В некоторых вариантах осуществления подходы с использованием дисплея включают генетическую модификацию, или модификацию, известного, исходного или эталонного TCR. Например, в некоторых случаях можно использовать TCR дикого типа в качестве матрицы для получения мутантного TCR, в котором один или более остатков областей CDR являются мутантными, и выбирают мутанты с желательным измененным свойством, например, с более высокой аффинностью для нужного антигена-мишени.

[0462] В некоторых вариантах осуществления пептиды полипептида-мишени для

использования в получении или создании интересующего TCR известны или могут быть с легкостью идентифицированы. В некоторых вариантах осуществления пептиды, подходящие для использования в получении TCR, или антигенсвязывающих фрагментов, можно определять на основании наличия HLA-рестрицированного мотива в интересующем полипептиде-мишени, таком как полипептид-мишень, описанный ниже. В некоторых вариантах осуществления пептиды идентифицируют с использованием доступных компьютерных моделей предсказания. В некоторых вариантах осуществления для предсказания связывающих сайтов MHC класса I такие модели включают, но без ограничения, ProPred1 (Singh and Raghava (2001) *Bioinformatics* 17(12):1236-1237) и SYFPEITHI (смотри Schuler et al. (2007) *Immunoinformatics Methods in Molecular Biology*, 409(1): 75-93 2007). В некоторых вариантах осуществления MHC-рестрицированный эпитоп представляет собой HLA-A0201, который экспрессируется у примерно 39-46% всех представителей белой европеоидной расы и, таким образом, является подходящим вариантом антигена MHC для использования в получении TCR или другой молекулы, связывающей MHC-пептид.

[0463] Можно использовать HLA-A0201-связывающие мотивы и сайты расщепления для протеасом и иммунопротеасом, полученные с использованием компьютерных моделей предсказания. Для предсказания сайтов связывания MHC класса I такие модели включают, но без ограничения, ProPred1 (описанную более подробно в публикации Singh and Raghava, ProPred: prediction of HLA-DR binding sites. *BIOINFORMATICS* 17(12):1236-1237 2001) и SYFPEITHI (смотри Schuler et al. SYFPEITHI, Database for Searching and T-Cell Epitope Prediction, в: *Immunoinformatics Methods in Molecular Biology*, vol 409(1): 75-93 2007).

[0464] В некоторых вариантах осуществления TCR, или его антигенсвязывающий фрагмент, может представлять собой получаемый рекомбинантными методами естественный белок, или его мутантную форму, у которой было изменено одно или более свойств, например, характеристики связывания. В некоторых вариантах осуществления TCR может быть получен от одного из различных видов животных, таких как человек, мышь, крыса или другое млекопитающее. TCR может быть связан с клеткой или находиться в растворимой форме. В некоторых вариантах осуществления для целей предложенных способов TCR находится в связанной с клеткой форме, экспрессируемой на поверхности клетки.

[0465] В некоторых вариантах осуществления TCR представляет собой полноразмерный TCR. В некоторых вариантах осуществления TCR представляет собой антигенсвязывающий фрагмент. В некоторых вариантах осуществления TCR представляет собой димерный TCR (дTCR). В некоторых вариантах осуществления TCR представляет собой одноцепочечный TCR (оцTCR). В некоторых вариантах осуществления дTCR или оцTCR имеют структуры, описанные в WO 03/020763, WO 04/033685, WO 2011/044186.

[0466] В некоторых вариантах осуществления TCR содержит последовательность, соответствующую трансмембранной последовательности. В некоторых вариантах

осуществления TCR не содержит последовательность, соответствующую цитоплазматической последовательности. В некоторых вариантах осуществления TCR способен к образованию комплекса TCR с CD3. В некоторых вариантах осуществления любой из TCR, включая дTCR или оTCR, может быть связан с сигнальными доменами, результатом чего является активный TCR на поверхности Т-клетки. В некоторых вариантах осуществления TCR экспрессируется на поверхности клеток.

[0467] В некоторых вариантах осуществления дTCR содержит первый полипептид, в котором последовательность, соответствующая последовательности вариабельной области  $\alpha$ -цепи TCR, слита с N-концом последовательности, соответствующей внеклеточной последовательности константной области  $\alpha$ -цепи TCR, и второй полипептид, в котором последовательность, соответствующая последовательности вариабельной области  $\beta$ -цепи TCR, слита с N-концом последовательности, соответствующей внеклеточной последовательности константной области  $\beta$ -цепи TCR, при этом первый и второй полипептиды связаны дисульфидной связью. В некоторых вариантах осуществления связь может соответствовать естественной межцепочечной дисульфидной связи, имеющейся в естественном димерном  $\alpha\beta$  TCR. В некоторых вариантах осуществления межцепочечные дисульфидные связи отсутствуют в естественном TCR. Например, в некоторых вариантах осуществления один или более остатков цистеина могут быть включены во внеклеточные последовательности константной области пары полипептидов дTCR. В некоторых случаях может быть желательной как естественная, так и не естественная, дисульфидная связь. В некоторых вариантах осуществления TCR содержит трансмембранную последовательность для закрепления в мембране.

[0468] В некоторых вариантах осуществления дTCR содержит  $\alpha$ -цепь TCR, содержащую вариабельный  $\alpha$ -домен, константный  $\alpha$ -домен и первый мотив димеризации, связанный с C-концом константного  $\alpha$ -домена, и  $\beta$ -цепь TCR, содержащую вариабельный  $\beta$ -домен, константный  $\beta$ -домен и второй мотив димеризации, связанный с C-концом константного  $\beta$ -домена, при этом первый и второй мотивы димеризации с легкостью взаимодействуют, с образованием ковалентной связи между аминокислотой в первом мотиве димеризации и аминокислотой во втором мотиве димеризации, соединяя вместе  $\alpha$ -цепь TCR и  $\beta$ -цепь TCR.

[0469] В некоторых вариантах осуществления TCR представляет собой оTCR. Как правило, оTCR может быть получен с использованием способов, известных специалистам в данной области, смотри, например, Soo Hoo, W. F. et al. PNAS (USA) 89, 4759 (1992); Wülfing, C. and Plücker, A., J. Mol. Biol. 242, 655 (1994); Kurucz, I. et al. PNAS (USA) 90 3830 (1993); международные опубликованные РСТ заявки №№ WO 96/13593, WO 96/18105, WO99/60120, WO99/18129, WO 03/020763, WO2011/044186; а также Schlueter, C. J. et al. J. Mol. Biol. 256, 859 (1996). В некоторых вариантах осуществления оTCR содержит введенную не естественную дисульфидную межцепочечную связь для облегчения связывания цепей TCR (смотри, например,

международную опубликованную РСТ заявку № WO 03/020763). В некоторых вариантах осуществления оцTCR представляет собой не связанный дисульфидной связью укороченный TCR, в котором гетерологичные лейциновые «застежки», слитые с его С-концами, обеспечивают связывание цепей (смотри, например, международную опубликованную РСТ заявку № WO99/60120). В некоторых вариантах осуществления оцTCR содержит переменный домен  $\alpha$ -цепи TCR, ковалентно связанный с переменным доменом  $\beta$ -цепи TCR через пептидный линкер (смотри, например, международную опубликованную РСТ заявку № WO99/18129).

[0470] В некоторых вариантах осуществления оцTCR 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, слитый с N-концом аминокислотной последовательности, соответствующей внеклеточной последовательности константного домена  $\beta$ -цепи TCR, и последовательность линкера, связывающую С-конец первого сегмента с N-концом второго сегмента.

[0471] В некоторых вариантах осуществления оцTCR 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 и трансмембранной последовательности  $\beta$ -цепи, и, необязательно, последовательность линкера, связывающую С-конец первого сегмента с N-концом второго сегмента.

[0472] В некоторых вариантах осуществления оцTCR 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 и трансмембранной последовательности  $\alpha$ -цепи, и, необязательно, последовательность линкера, связывающую С-конец первого сегмента с N-концом второго сегмента.

[0473] В некоторых вариантах осуществления линкер оцTCR, который связывает первый и второй сегменты TCR, может представлять собой любой линкер, способный к образованию одной полипептидной цепи, с сохранением при этом специфичности связывания TCR. В некоторых вариантах осуществления последовательность линкера может, например, иметь формулу -P-AA-P-, где P представляет собой пролин и AA представляет собой аминокислотную последовательность, в которой аминокислоты представляют собой глицин и серин. В некоторых вариантах осуществления первый и второй сегменты образуют пару, так что их последовательности переменных областей ориентированы для такого связывания. Таким образом, в некоторых случаях линкер имеет достаточную длину для создания пространства между С-концом первого сегмента и N-концом второго сегмента, или наоборот, но он является не слишком длинным для

блокирования уменьшения связывания оцTCR с лигандом-мишенью. В некоторых вариантах осуществления линкер может содержать от или от примерно, 10 до 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>-P-, 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).

[0474] В некоторых вариантах осуществления оцTCR содержит ковалентную дисульфидную связь, соединяющую остаток области константного домена  $\alpha$ -цепи иммуноглобулина с остатком области константного домена  $\beta$ -цепи иммуноглобулина. В некоторых вариантах осуществления межцепочечная дисульфидная связь в естественном TCR отсутствует. Например, в некоторых вариантах осуществления один или более остатков цистеина могут быть включены во внеклеточные последовательности константных областей первого и второго сегментов полипептида оцTCR. В некоторых случаях может быть желательной как естественная, так и не естественная, дисульфидная связь.

[0475] В некоторых вариантах осуществления дTCR или оцTCR, содержащих введенные межцепочечные дисульфидные связи, естественные дисульфидные связи отсутствуют. В некоторых вариантах осуществления один или более естественных остатков цистеина, образующих естественные межцепочечные дисульфидные связи, заменены на другой остаток, например, на серин или аланин. В некоторых вариантах осуществления введенная дисульфидная связь может быть образована за счет мутации остатков, отличных от цистеина, в первом и втором сегментах на цистеин. Иллюстративные не естественные дисульфидные связи TCR описаны в международной опубликованной РСТ заявке № WO2006/000830.

[0476] В некоторых вариантах осуществления TCR, или его антигенсвязывающий фрагмент, имеет аффинность с равновесной константой связывания для антигена-мишени, составляющей от или от примерно,  $10^{-5}$  до  $10^{-12}$  М, включая все промежуточные отдельные значения и диапазоны. В некоторых вариантах осуществления антиген-мишень представляет собой комплекс МНС-пептид или лиганд.

[0477] В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота или нуклеиновые кислоты, кодирующие TCR, например, цепи  $\alpha$  и  $\beta$ , могут быть амплифицированы ПЦР, клонированы или подвергнуты другим соответствующим процедурам и клонированы, в подходящий экспрессионный вектор или векторы. Экспрессионный вектор может представлять собой любой подходящий рекомбинантный экспрессионный вектор, и может быть использован для трансформации или трансфекции любого подходящего хозяина. Соответствующие векторы включают векторы, предназначенные для размножения или наращивания, или для экспрессии, или и того, и другого, например, плазмиды и вирусы.



[0478] В некоторых вариантах осуществления вектор может представлять собой вектор 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 можно использовать векторы на основе бактериофагов, такие как  $\lambda$ G10,  $\lambda$ GT11,  $\lambda$ ZapII (Stratagene),  $\lambda$ EMBL4 и  $\lambda$ NM1149. В некоторых вариантах осуществления можно использовать растительные экспрессионные векторы, которые включают pBI01, pBI101.2, pBI101.3, pBI121 и pBIN19 (Clontech). В некоторых вариантах осуществления животные экспрессионные векторы включают pEUK-C1, pMAM и pMAMneo (Clontech). В некоторых вариантах осуществления используют вирусный вектор, например, ретровирусный вектор.

[0479] В некоторых вариантах осуществления рекомбинантные экспрессионные векторы могут быть получены с использованием стандартных методов рекомбинантных ДНК. В некоторых вариантах осуществления векторы могут содержать регуляторные последовательности, такие как последовательности инициации транскрипции и трансляции, и кодоны терминации, которые специфичны для типа хозяина (например, бактерий, грибов, растений или животных), в которого предстоит вводить вектор, по мере необходимости и с учетом того, является ли вектор ДНК-содержащим или РНК-содержащим вектором. В некоторых вариантах осуществления вектор может содержать неприродный промотор, функционально связанный с нуклеотидной последовательностью, кодирующей TCR или антигенсвязывающий фрагмент (или другую связывающую МНС-пептид молекулу). В некоторых вариантах осуществления промотор может представлять собой невирусный промотор или вирусный промотор, такой как промотор цитомегаловируса (CMV), промотор SV40, промотор RSV и промотор, присутствующий в длинном концевом повторе вируса мышинных стволовых клеток. Также предусмотрены и другие известные промоторы.

[0480] В некоторых вариантах осуществления для получения вектора, кодирующего TCR, цепи  $\alpha$  и  $\beta$  амплифицируют методом ПЦР из суммарной кДНК, выделенной из Т-клеточного клона, экспрессирующего интересующий TCR, и клонируют в экспрессионный вектор. В некоторых вариантах осуществления цепи  $\alpha$  и  $\beta$  клонируют в один и тот же вектор. В некоторых вариантах осуществления цепи  $\alpha$  и  $\beta$  клонируют в разные векторы. В некоторых вариантах осуществления созданные цепи  $\alpha$  и  $\beta$  вводят в ретровирусный, например, лентивирусный, вектор.

#### **V. Композиции, препараты и способы введения**

[0481] В некоторых вариантах осуществления произведенные композиции обогащенных Т-клеток, полученные способами, предложенными в настоящем документе, например, описанными в разделе I, вводят в качестве клеточной терапии, например, адоптивной клеточной терапии. В конкретных вариантах осуществления одну или более клеточных композиций, например, произведенных клеточных композиций, описанных в настоящем документе, вводят в качестве клеточной терапии. В некоторых вариантах осуществления методы адоптивной Т-клеточной терапии описаны, например, в

публикации патентной заявки США № 2003/0170238, авторов Gruenberg et al.; патенте США № 4690915, выданном Rosenberg; публикации Rosenberg (2011) *Nat Rev Clin Oncol.* 8(10):577-85). Смотри, 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.

[0482] В конкретных вариантах осуществления способы, предложенные в настоящем документе, приводят к получению одной произведенной композиции обогащенных Т-клеток из исходных клеток, выделенных, отобранных и/или обогащенных из одного биологического образца, которую вводят в качестве клеточной терапии. В конкретных вариантах осуществления одна произведенная композиция представляет собой композицию обогащенных CD4<sup>+</sup> Т-клеток. В конкретных вариантах осуществления одна произведенная композиция представляет собой композицию обогащенных CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления способы, предложенные в настоящем документе, приводят к получению двух или более произведенных 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 произведенные композиции вводят субъекту отдельно. В конкретных вариантах осуществления две или более произведенные композиции объединяют в одну композицию и вводят субъекту. В конкретных вариантах осуществления две или более произведенные композиции включают произведенную композицию обогащенных CD4<sup>+</sup> Т-клеток. В конкретных вариантах осуществления две или более произведенные композиции включают произведенную композицию обогащенных CD8<sup>+</sup>Т-клеток.

[0483] В некоторых вариантах осуществления произведенная композиция обогащенных CD4<sup>+</sup> Т-клеток, которую вводят субъекту, содержит 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 примерно 100% CD4<sup>+</sup> Т-клеток. В конкретных вариантах осуществления произведенная композиция 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 примерно 100% CD4<sup>+</sup> Т-клеток, которые экспрессируют рекомбинантный рецептор и/или были трансдуцированы или трансфицированы рекомбинантным полинуклеотидом. В конкретных вариантах осуществления произведенная композиция обогащенных CD4<sup>+</sup> Т-клеток, которую вводят субъекту, содержит менее 40%, менее 35%, менее 30%, менее 25%, менее 20%, менее 15%, менее 10%, менее 5%, менее 1%, менее 0,1% или менее 0,01% CD8<sup>+</sup> Т-клеток, и/или не содержит CD8<sup>+</sup> Т-клетки, и/или свободна, или практически свободна, от CD8<sup>+</sup> Т-клеток.

[0484] В некоторых вариантах осуществления произведенная композиция обогащенных CD8<sup>+</sup> Т-клеток, которую вводят субъекту, содержит 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 примерно 100% CD8<sup>+</sup> Т-клеток. В конкретных вариантах осуществления композиция 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 примерно 100% CD8<sup>+</sup> Т-клеток, которые экспрессируют рекомбинантный рецептор и/или были трансдуцированы или трансфицированы рекомбинантным полинуклеотидом. В конкретных вариантах осуществления произведенная композиция обогащенных CD8<sup>+</sup> Т-клеток, которую вводят субъекту, содержит менее 40%, менее 35%, менее 30%, менее 25%, менее 20%, менее 15%, менее 10%, менее 5%, менее 1%, менее 0,1% или менее 0,01% CD4<sup>+</sup> Т-клеток, и/или не содержит CD4<sup>+</sup> Т-клетки, и/или свободна, или практически свободна, от CD4<sup>+</sup> Т-клеток.

[0485] Заболевание или состояние, которое подвергают лечению, может быть любым из тех, при которых экспрессия антигена связана с, и/или вовлечена в этиологию заболевания, состояния или нарушения, например, вызывает, усугубляет или иным образом участвует в таком заболевании, состоянии или нарушении. Иллюстративные заболевания и состояния могут включать заболевания или состояния, связанные со злокачественностью или трансформацией клеток (например, рак), аутоиммунное или воспалительное заболевание, или инфекционное заболевание, например, вызываемое бактериальным, вирусным или иным патогеном. Иллюстративные антигены, включающие антигены, ассоциированные с различными заболеваниями и состояниями, которые могут быть подвергнуты лечению, описаны выше. В конкретных вариантах осуществления химерный антигенный рецептор или трансгенный TCR специфически связывает антиген, связанный с заболеванием или состоянием.

[0486] В число заболеваний, состояний и нарушений входят опухоли, включая солидные опухоли, злокачественные новообразования крови и меланомы, и включая локализованные и метастатические опухоли, инфекционные заболевания, такие как инфекция, вызываемая вирусом или другим патогеном, например, HIV, HCV, HBV, CMV, HPV, паразитарные заболевания, а также аутоиммунные и воспалительные заболевания. В некоторых вариантах осуществления заболевание, нарушение или состояние представляет собой опухоль, рак, злокачественное новообразование или другое пролиферативное заболевание или нарушение. Такие заболевания включают, но не ограничиваются ими, лейкоз, лимфому, например, острый миелоидный (или миелогенный) лейкоз (AML), хронический миелоидный (или миелогенный) лейкоз (CML), острый лимфоцитарный (или лимфобластный) лейкоз (ALL), хронический лимфоцитарный лейкоз (CLL), волосатоклеточный лейкоз (HCL), мелколимфоцитарную лимфому (SLL), лимфому из

клеток мантийной зоны (MCL), лимфому из клеток маргинальной зоны, лимфому Беркитта, лимфому Ходжкина (HL), неходжкинскую лимфому (NHL), анапластическую крупноклеточную лимфому (ALCL), фолликулярную лимфому, рефрактерную фолликулярную лимфому, диффузную крупноклеточную В-клеточную лимфому (DLBCL) и множественную миелому (MM). В некоторых вариантах осуществления заболевание или состояние представляет собой В-клеточное злокачественное новообразование, выбранное из острого лимфобластного лейкоза (ALL), ALL взрослых, хронического лимфобластного лейкоза (CLL), неходжкинской лимфомы (NHL) и диффузной крупноклеточной В-клеточной лимфомы (DLBCL). В некоторых вариантах осуществления заболевание или состояние представляет собой NHL, и NHL выбирают из группы, состоящей из агрессивной NHL, диффузной крупноклеточной В-клеточной лимфомы (DLBCL), NOS (de novo и переродившейся из медленно растущей), первичной медиастинальной крупноклеточной В-клеточной лимфомы (PMBCL), В-крупноклеточной лимфомы, богатой Т-клетками/гистиоцитами (TCHRBCL), лимфомы Беркитта, лимфомы из клеток мантийной зоны (MCL) и/или фолликулярной лимфомы (FL), необязательно, фолликулярной лимфомы стадии 3В (FL3В). В некоторых аспектах рекомбинантный рецептор, такой как CAR, специфически связывает антиген, ассоциированный с заболеванием или состоянием, или экспрессируемый в клетках, окружающих лезию, связанную с В-клеточным злокачественным новообразованием. В некоторых вариантах осуществления антигены, являющиеся мишенями рецепторов, включают антигены, ассоциированные с В-клеточным злокачественным новообразованием, например, любой из целого ряда 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 сочетания.

[0487] В некоторых вариантах осуществления заболевание или состояние представляет собой миелому, такую как множественная миелома. В некоторых аспектах рекомбинантный рецептор, такой как CAR, специфически связывает антиген, ассоциированный с заболеванием или состоянием, или экспрессируемый в клетках, окружающих лезию, связанную с множественной миеломой. В некоторых вариантах осуществления антигены, являющиеся мишенями рецепторов, включают антигены, ассоциированные с множественной миеломой. В некоторых аспектах антиген, например, второй или дополнительный антиген, такой как характерный для заболевания антиген и/или связанный с заболеванием антиген, экспрессируется на клетках множественной миеломы, например, антиген созревания В-клеток (BCMA), представитель D класса С группы 5 связанных с G-белками 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, TAC1 и/или FcRH5. Другие иллюстративные 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. Bensen 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 на лимфоидных опухолях, миеломе, СПИД-ассоциированной лимфоме, и/или при пост-трансплантационных лимфопролиферативных состояниях, например, CD38. Антитела или антигенсвязывающие фрагменты, направленные против таких антигенов, известны и включают, например, те, которые описаны в патентах США №№ 8153765; 8603477, 8008450; публикации патентной заявки США № US20120189622 или US20100260748; и/или международных РСТ публикациях №№ WO2006099875, WO2009080829 или WO2012092612, или WO2014210064. В некоторых вариантах осуществления такие антитела, или их антигенсвязывающие фрагменты (например, scFv), содержатся в мультиспецифических антителах, мультиспецифических химерных рецепторах, таких как мультиспецифические CAR, и/или мультиспецифических клетках.

[0488] В некоторых вариантах осуществления заболевание или состояние представляет собой инфекционное заболевание или состояние, такое как, но без ограничения, вирусная, ретровирусная, бактериальная и вызываемая простейшими инфекция, иммунодефицит, инфекция, вызываемая цитомегаловирусом (CMV), вирусом Эпштейна-Барр (EBV), аденовирусом, ВК полиомавирусом. В некоторых вариантах осуществления заболевание или состояние представляет собой аутоиммунное или воспалительное заболевание или состояние, такое как артрит, например, ревматоидный артрит (RA), диабет I типа, системная красная волчанка (SLE), воспалительное заболевание кишечника, псориаз, склеродермия, аутоиммунное заболевание щитовидной железы, болезнь Грэйвса, болезнь Крона, рассеянный склероз, астма и/или заболевание или состояние, связанное с получением трансплантата.

[0489] В некоторых вариантах осуществления антиген, ассоциированный с заболеванием или нарушением, выбирают из интегрина  $\alpha\beta6$  (интегрин  $\alpha v\beta 6$ ), антигена созревания В-клеток (BCMA), В7-Н6, карбоангидразы 9 (CA9, также известной как CAIX или G250), раково-тестикулярного антигена, раково-тестикулярного антигена 1В (СТАГ, также известного как NY-ESO-1 и LAGE-2), карциноэмбрионального антигена (CEA), циклина, циклина А2, лиганда 1 хемокина с мотивом С-С (CCL-1), CD19, CD20, CD22, CD23, CD24, CD30, CD33, CD38, CD44, CD44v6, CD44v7/8, CD123, CD138, CD171, белка эпидермального фактора роста (EGFR), укороченного 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), рецептора эстрогена, подобного Fc-рецептору белка 5 (FCRL5; также известного как гомолог Fc-рецептора 5 или FCRH5), эмбрионального ацетилхолинового рецептора (эмбрионального AchR), фолатсвязывающего белка (FBP), фолатного рецептора альфа, эмбрионального ацетилхолинового рецептора, ганглиозида GD2, О-ацетилированного GD2 (OGD2), ганглиозида GD3, гликопротеина 100 (gp100), Her2/neu (рецептора тирозинкиназы erbB2),

Her3 (erb-B3), Her4 (erb-B4), димеров erbB, человеческого высокомолекулярного антигена, связанного с меланомой (HMW-MAA), поверхностного антигена вируса гепатита В, человеческого лейкоцитарного антигена A1 (HLA-A1), человеческого лейкоцитарного антигена A2 (HLA-A2), рецептора альфа IL-22 (IL-22R $\alpha$ ), рецептора альфа 2 IL-13 (IL-13R $\alpha$ 2), рецептора домена киназной вставки (kdr), легкой цепи каппа, L1-молекулы клеточной адгезии (L1-CAM), CE7 эпитопа L1-CAM, представителя А семейства 8 белков, содержащих богатые лейцином повторы (LRRC8A), Lewis Y, меланома-ассоциированного антигена (MAGE)-A1, MAGE-A3, MAGE-A6, мезотелина, с-Met, мышинового цитомегаловируса (CMV), муцина 1 (MUC1), MUC16, лигандов представителя D группы 2 естественных киллеров (NKG2D), мелана А (MART-1), молекулы нейрональной клеточной адгезии (NCAM), онкоэмбрионального антигена, предпочтительно экспрессируемого антигена меланомы (PRAME), рецептора прогестерона, простатического специфического антигена, антигена простатических стволовых клеток (PSCA), простатического специфического мембранного антигена (PSMA), подобного тирозинкиназному рецептору рецептора-сироты 1 (ROR1), сурвивина, трофобластного гликопротеина (TPBG, также известного как 5T4), опухоль-ассоциированного гликопротеина 72 (TAG72), рецептора фактора роста эндотелия сосудов (VEGFR), рецептора фактора роста эндотелия сосудов 2 (VEGFR2), антигена опухоли Вильмса 1 (WT-1), специфического для патогена или экспрессируемого патогеном антигена, или антигена, связанного с универсальным маркером, и/или биотинилированных молекул, и/или молекул, экспрессируемых HIV, HCV, HBV или другими патогенами. В некоторых вариантах осуществления антигены, являющиеся мишенями для рецепторов, включают антигены, ассоциированные с В-клеточными злокачественными новообразованиями, например, любые из целого ряда 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. В некоторых вариантах осуществления антиген представляет собой специфический для патогена антиген. В некоторых вариантах осуществления антиген представляет собой вирусный антиген (такой как вирусный антиген из HIV, HCV, HBV и так далее), бактериальные антигены и/или паразитарные антигены.

[0490] В некоторых вариантах осуществления клеточную терапию, например, адоптивную Т-клеточную терапию, осуществляют путем аутологичного переноса, при котором клетки выделяют и/или иным образом получают от субъекта, которому предстоит получать клеточную терапию, или из образца, полученного от такого субъекта. Таким образом, в некоторых аспектах клетки получают от субъекта, например, пациента, который нуждается в лечении, и клетки после выделения и обработки вводят тому же субъекту.

[0491] В некоторых вариантах осуществления клеточную терапию, например, адоптивную Т-клеточную терапию, осуществляют путем аллогенного переноса, при котором клетки выделяют и/или иным образом получают от субъекта, иного, чем субъект,

которому предстоит получать, или который в итоге получает, клеточную терапию, например, первого субъекта. В таких вариантах осуществления клетки затем вводят другому субъекту, например, второму субъекту, относящемуся к тому же биологическому виду. В некоторых вариантах осуществления первый и второй субъекты генетически идентичны. В некоторых вариантах осуществления первый и второй субъекты имеют генетическое сходство. В некоторых вариантах осуществления у второго субъекта экспрессируются молекулы того же класса или супертипа HLA, что и у первого субъекта.

[0492] Клетки, например, генетически модифицированные клетки, полученные способом, описанным в разделе I, можно вводить любыми подходящими способами. В конкретных вариантах осуществления клетки из двух или более отдельных произведенных композиций, например, композиций обогащенных Т-клеток, полученных способами, описанными в разделе I, объединяют в одну композицию клеток для введения. В конкретных вариантах осуществления клетки из отдельных произведенных композиций вводят субъекту отдельно. В конкретных вариантах осуществления CD4<sup>+</sup> Т-клетки вводят отдельно от CD8<sup>+</sup> Т-клеток.

[0493] В некоторых вариантах осуществления клетки можно вводить болюсной инфузией, инъекцией, например, внутривенной или подкожной инъекцией, внутриглазной инъекцией, окологлазной инъекцией, субретинальной инъекцией, интравитреальной инъекцией, трансептальной инъекцией, субсклеральной инъекцией, интрахориоидальной инъекцией, внутрикамерной инъекцией, субконъюнктивальной инъекцией, субконъюнктивальной инъекцией, субтеноновой инъекцией, ретробульбарной инъекцией, перibuльбарной инъекцией или задним окологсклеральным введением. В некоторых вариантах осуществления клетки вводят парентеральным, внутрилегочным и интраназальным путем введения и, если это необходимо для локального лечения, внутриочаговым путем введения. Парентеральные инфузии включают внутримышечный, внутривенный, внутриартериальный, внутрибрюшинный или подкожный пути введения. В некоторых вариантах осуществления конкретную дозу вводят путем одиночного болюсного введения клеток. В некоторых вариантах осуществления дозы вводят путем нескольких болюсных введений клеток, например, на протяжении не более 3 дней, или путем непрерывной инфузии клеток. В некоторых вариантах осуществления введение дозы клеток или любой дополнительной терапии, например, лимфодеплеции, медицинского вмешательства и/или комбинированной терапии, проводят амбулаторно.

[0494] Для предотвращения или лечения заболевания соответствующая доза может зависеть от типа заболевания, которое предстоит лечить, типа клеток или рекомбинантных рецепторов, степени тяжести и течения заболевания, от того, вводят ли клетки с профилактической или терапевтической целью, от предыдущей терапии, клинической истории субъекта и его ответа на клетки, а также от решения лечащего врача. В некоторых вариантах осуществления композиции и клетки предпочтительно вводят субъекту однократно или в серии процедур.

[0495] В некоторых вариантах осуществления клетки вводят в виде части

комбинированной терапии, например, одновременно или последовательно, в любом порядке, с другим терапевтическим вмешательством, например, с использованием антитела или генетически модифицированной клетки, или рецептора, или средства, такого как цитотоксическое или терапевтическое средство. В некоторых вариантах осуществления клетки вводят совместно с одним или более дополнительными терапевтическими средствами, или в сочетании с другим терапевтическим вмешательством, либо одновременно, либо последовательно в любом порядке. В некоторых контекстах клетки вводят совместно с другим терапевтическим средством достаточно близко по времени, так что клеточные популяции усиливают эффект одного или более дополнительных терапевтических средств, или наоборот. В некоторых вариантах осуществления клетки вводят до введения одного или более дополнительных терапевтических средств. В некоторых вариантах осуществления клетки вводят после введения одного или более дополнительных терапевтических средств. В некоторых вариантах осуществления одно или более дополнительных средств включают цитокин, такой как IL-2, например, для повышения персистенции. В некоторых вариантах осуществления способы включают введение химиотерапевтического средства.

[0496] В некоторых вариантах осуществления способы включают введение химиотерапевтического средства, например, прекондиционирующего химиотерапевтического средства, например, для уменьшения опухолевой нагрузки перед введением клеток.

[0497] Прекондиционирование субъектов за счет иммунодепрессии (например, лимфодепрессии) в некоторых аспектах может повышать эффект адоптивной клеточной терапии (АКТ).

[0498] Таким образом, в некоторых вариантах осуществления способы включают введение субъекту прекондиционирующего средства, например, лимфодепрессионного или химиотерапевтического средства, такого как циклофосфамид, флударабин, или их сочетания, до начала клеточной терапии. Например, субъекту можно вводить прекондиционирующее 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 более чем за 7 дней, например, не более чем за 6, 5, 4, 3 или 2 дня, до начала клеточной терапии.

[0499] В некоторых вариантах осуществления субъект получает прекондиционирующее средство циклофосфамид в дозе от или от примерно, 20 мг/кг до 100 мг/кг, например, от или от примерно, 40 мг/кг до 80 мг/кг. В некоторых аспектах субъект получает прекондиционирующее средство циклофосфамид в дозе, или дозе примерно, 60 мг/кг. В некоторых вариантах осуществления циклофосфамид можно вводить в одной дозе или можно вводить в нескольких дозах, например, ежедневно, через день 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 лимфодепрессионное средство представляет собой циклофосфамид, субъекту вводят



циклофосфамид в дозе от или от примерно,  $100 \text{ мг/м}^2$  до  $500 \text{ мг/м}^2$ , например, от или от примерно,  $200 \text{ мг/м}^2$  до  $400 \text{ мг/м}^2$ , или от  $250 \text{ мг/м}^2$  до  $350 \text{ мг/м}^2$ , включая все значения диапазонов. В некоторых случаях субъекту вводят примерно  $300 \text{ мг/м}^2$  циклофосфамида. В некоторых вариантах осуществления циклофосфамид можно вводить в одной дозе или можно вводить в нескольких дозах, например, ежедневно, через день или раз в три дня. В некоторых вариантах осуществления циклофосфамид вводят ежедневно, например, в течение 1-5 дней, например, от 3 до 5 дней. В некоторых случаях субъекту вводят примерно  $300 \text{ мг/м}^2$  циклофосфамида ежедневно в течение 3 дней, до начала проведения клеточной терапии.

[0500] В некоторых вариантах осуществления, когда лимфодеплеционное средство представляет собой флударабин, субъекту вводят флударабин в дозе от или от примерно,  $1 \text{ мг/м}^2$  до  $100 \text{ мг/м}^2$ , например, от или от примерно,  $10 \text{ мг/м}^2$  до  $75 \text{ мг/м}^2$ , от  $15 \text{ мг/м}^2$  до  $50 \text{ мг/м}^2$ , от  $20 \text{ мг/м}^2$  до  $40 \text{ мг/м}^2$  или от  $24 \text{ мг/м}^2$  до  $35 \text{ мг/м}^2$ , включая все значения диапазонов. В некоторых случаях субъекту вводят примерно  $30 \text{ мг/м}^2$  флударабина. В некоторых вариантах осуществления флударабин можно вводить в одной дозе или можно вводить в нескольких дозах, например, ежедневно, через день или раз в три дня. В некоторых вариантах осуществления флударабин вводят ежедневно, например, в течение 1-5 дней, например, от 3 до 5 дней. В некоторых случаях субъекту вводят примерно  $30 \text{ мг/м}^2$  флударабина ежедневно в течение 3 дней, до начала проведения клеточной терапии.

[0501] В некоторых вариантах осуществления лимфодеплеционное средство включает сочетание средств, например, сочетание циклофосфамида и флударабина. Таким образом, сочетание средств может включать циклофосфамид в любой дозе или с любой схемой введения, например, как описано выше, и флударабин в любой дозе или с любой схемой введения, например, как описано выше. Например, в некоторых аспектах субъекту вводят  $60 \text{ мг/кг}$  ( $\sim 2 \text{ г/м}^2$ ) циклофосфамида и 3-5 доз  $25 \text{ мг/м}^2$  флударабина до введения первой или следующей дозы.

[0502] В некоторых вариантах осуществления после введения клеток биологическую активность популяций генетически модифицированных клеток определяют, например, одним из множества известных способов. Оцениваемые параметры включают специфическое связывание генетически модифицированной или естественной Т-клетки или другой иммунной клетки с антигеном *in vivo*, например, путем визуализации, или *ex vivo*, например, методами ELISA или проточной цитометрии. В конкретных вариантах осуществления способность генетически модифицированных клеток уничтожать клетки-мишени можно определять любыми подходящими известными методами, например, в анализе цитотоксичности, описанном, 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 конкретных вариантах осуществления биологическую активность клеток определяют путем анализа экспрессии и/или секреции одного или более цитокинов, таких как  $\text{CD107}\alpha$ ,  $\text{IFN}\gamma$ ,  $\text{IL-2}$  и  $\text{TNF}$ . В некоторых аспектах биологическую активность определяют путем оценки клинического результата, например,

по уменьшению опухолевой нагрузки.

[0503] В конкретных вариантах осуществления генетически модифицированные клетки дополнительно модифицируют разными способами для повышения их терапевтической и профилактической эффективности. Например, генетически модифицированный CAR или TCR, экспрессируемый клетками в популяции, можно конъюгировать, либо непосредственно, либо опосредованно через линкер, с направляющим фрагментом. Практика конъюгации соединений, например, CAR или TCR, с направляющим фрагментом известна. Смотри, например, Wadwa et al., *J. Drug Targeting* 3: 111 (1995), и патент США 5087616.

[0504] В некоторых вариантах осуществления дозу клеток вводят субъектам в соответствии с предложенными способами и/или с предоставленными изделиями или композициями. В некоторых вариантах осуществления количество или время введения доз определяют в зависимости от конкретного заболевания или состояния у субъекта. В некоторых случаях количество или время введения доз для лечения конкретного заболевания можно определять эмпирически, с учетом предоставленного описания.

[0505] В некоторых вариантах осуществления доза клеток содержит от или от примерно  $2 \times 10^5$  клеток/кг до или до примерно  $2 \times 10^6$  клеток/кг, например, от или от примерно  $4 \times 10^5$  клеток/кг до или до примерно  $1 \times 10^6$  клеток/кг, или от или от примерно  $6 \times 10^5$  клеток/кг до или до примерно  $8 \times 10^5$  клеток/кг. В некоторых вариантах осуществления доза клеток содержит не более  $2 \times 10^5$  клеток (например, экспрессирующих антигенный рецептор, например, экспрессирующих CAR клеток) на килограмм массы тела субъекта (клеток/кг), например, не более чем, или примерно,  $3 \times 10^5$  клеток/кг, не более чем, или примерно,  $4 \times 10^5$  клеток/кг, не более чем, или примерно,  $5 \times 10^5$  клеток/кг, не более чем, или примерно,  $6 \times 10^5$  клеток/кг, не более чем, или примерно,  $7 \times 10^5$  клеток/кг, не более чем, или примерно,  $8 \times 10^5$  клеток/кг, не более чем, или примерно,  $9 \times 10^5$  клеток/кг, не более чем, или примерно,  $1 \times 10^6$  клеток/кг, или не более чем, или примерно,  $2 \times 10^6$  клеток/кг. В некоторых вариантах осуществления доза клеток содержит по меньшей мере, или по меньшей мере примерно, или содержит, или содержит примерно  $2 \times 10^5$  клеток (например, экспрессирующих антигенный рецептор, например, экспрессирующих CAR клеток) на килограмм массы тела субъекта (клеток/кг), содержит по меньшей мере, или по меньшей мере примерно, или содержит, или содержит примерно  $3 \times 10^5$  клеток/кг, содержит по меньшей мере, или по меньшей мере примерно, или содержит, или содержит примерно  $4 \times 10^5$  клеток/кг, содержит по меньшей мере, или по меньшей мере примерно, или содержит, или содержит примерно  $5 \times 10^5$  клеток/кг, содержит по меньшей мере, или по меньшей мере примерно, или содержит, или содержит примерно  $6 \times 10^5$  клеток/кг, содержит по меньшей мере, или по меньшей мере примерно, или содержит, или содержит примерно  $7 \times 10^5$  клеток/кг, содержит по меньшей мере, или по меньшей мере примерно, или содержит, или содержит примерно  $8 \times 10^5$  клеток/кг, содержит по меньшей мере, или по меньшей мере примерно, или содержит, или содержит примерно  $9 \times 10^5$  клеток/кг, содержит по меньшей мере, или по меньшей мере примерно,

или содержит, или содержит примерно  $1 \times 10^6$  клеток/кг, или содержит по меньшей мере, или по меньшей мере примерно, или содержит, или содержит примерно  $2 \times 10^6$  клеток/кг.

[0506] В конкретных вариантах осуществления клетки, или отдельные популяции подтипов клеток, вводят субъекту в диапазоне количеств от примерно одного миллиона до примерно 100 миллиардов клеток, и/или количество клеток в расчете на килограмм массы тела, такое как, например, от 1 миллиона до примерно 50 миллиардов клеток (например, примерно 5 миллионов клеток, примерно 25 миллионов клеток, примерно 500 миллионов клеток, примерно 1 миллиард клеток, примерно 5 миллиардов клеток, примерно 20 миллиардов клеток, примерно 30 миллиардов клеток, примерно 40 миллиардов клеток, или в диапазоне, определяемом любыми двумя из перечисленных значений), например, от примерно 10 миллионов до примерно 100 миллиардов клеток (например, примерно 20 миллионов клеток, примерно 30 миллионов клеток, примерно 40 миллионов клеток, примерно 60 миллионов клеток, примерно 70 миллионов клеток, примерно 80 миллионов клеток, примерно 90 миллионов клеток, примерно 10 миллиардов клеток, примерно 25 миллиардов клеток, примерно 50 миллиардов клеток, примерно 75 миллиардов клеток, примерно 90 миллиардов клеток, или в диапазоне, определяемом любыми двумя из перечисленных значений), и в некоторых случаях от примерно 100 миллионов клеток до примерно 50 миллиардов клеток (например, примерно 120 миллионов клеток, примерно 250 миллионов клеток, примерно 350 миллионов клеток, примерно 450 миллионов клеток, примерно 650 миллионов клеток, примерно 800 миллионов клеток, примерно 900 миллионов клеток, примерно 3 миллиарда клеток, примерно 30 миллиардов клеток, примерно 45 миллиардов клеток) или любое промежуточное значение в данных диапазонах, и/или в расчете на килограмм массы тела. Дозы могут варьироваться в зависимости от характерных особенностей заболевания или нарушения и/или пациента, и/или других видов лечения.

[0507] В некоторых вариантах осуществления доза клеток представляет собой постоянную дозу клеток или фиксированную дозу клеток, то есть, доза клеток не связана или не основана на площади поверхности тела или массе тела субъекта.

[0508] В некоторых вариантах осуществления например, когда субъект является человеком, доза включает менее примерно  $1 \times 10^8$  всех экспрессирующих рекомбинантный рецептор (например, CAR) клеток, Т-клеток или мононуклеарных клеток периферической крови (МПКК), например, в диапазоне от примерно  $1 \times 10^6$  до  $1 \times 10^8$  таких клеток, например, всего  $2 \times 10^6$ ,  $5 \times 10^6$ ,  $1 \times 10^7$ ,  $5 \times 10^7$  или  $1 \times 10^8$  таких клеток, или в диапазоне между любыми двумя вышеуказанными значениями. В некоторых вариантах осуществления например, когда субъект является человеком, доза включает от примерно  $1 \times 10^6$  до  $3 \times 10^8$  всех экспрессирующих рекомбинантный рецептор (например, CAR) клеток, например, в диапазоне от примерно  $1 \times 10^7$  до  $2 \times 10^8$  таких клеток, например, всего  $1 \times 10^7$ ,  $5 \times 10^7$ ,  $1 \times 10^8$  или  $1,5 \times 10^8$  таких клеток, или в диапазоне между любыми двумя вышеуказанными значениями. В некоторых вариантах осуществления пациенту вводят несколько доз, и каждая из доз или общая доза может находиться в пределах любого из

вышеуказанных значений. В некоторых вариантах осуществления введение дозы клеток включает введение от или от примерно  $1 \times 10^5$  до  $5 \times 10^8$  суммарных экспрессирующих рекомбинантный рецептор Т-клеток или суммарных Т-клеток, от  $1 \times 10^5$  до  $1 \times 10^8$  суммарных экспрессирующих рекомбинантный рецептор Т-клеток или суммарных Т-клеток, от или от примерно  $5 \times 10^5$  до  $1 \times 10^7$  суммарных экспрессирующих рекомбинантный рецептор Т-клеток или суммарных Т-клеток, или от или от примерно  $1 \times 10^6$  до  $1 \times 10^7$  суммарных экспрессирующих рекомбинантный рецептор Т-клеток или суммарных Т-клеток, в каждом случае включительно.

[0509] В некоторых вариантах осуществления Т-клетки дозы включают CD4+ Т-клетки, CD8+ Т-клетки или CD4+ и CD8+ Т-клетки.

[0510] В некоторых вариантах осуществления, например, когда субъект является человеком, доза CD8+ Т-клеток, входящая в дозу, содержащую CD4+ и CD8+ Т-клетки, составляет от примерно  $1 \times 10^6$  до  $1 \times 10^8$  суммарных экспрессирующих рекомбинантный рецептор (например, CAR) CD8+ клеток, например, в диапазоне от примерно  $5 \times 10^6$  до  $1 \times 10^8$  таких клеток,  $1 \times 10^7$ ,  $2,5 \times 10^7$ ,  $5 \times 10^7$ ,  $7,5 \times 10^7$ ,  $1 \times 10^8$  или  $5 \times 10^8$  таких клеток, или в диапазоне между любыми двумя вышеуказанными значениями. В некоторых вариантах осуществления пациенту вводят несколько доз, и каждая из доз, или суммарная доза, может находиться в пределах вышеуказанных значений. В некоторых вариантах осуществления вводят дозу клеток, составляющую от или от примерно,  $1 \times 10^7$  до  $0,75 \times 10^8$  суммарных экспрессирующих рекомбинантный рецептор CD8+ Т-клеток, от  $1 \times 10^7$  до  $2,5 \times 10^7$  суммарных экспрессирующих рекомбинантный рецептор CD8+ Т-клеток, от или от примерно,  $1 \times 10^7$  до  $0,75 \times 10^8$  суммарных экспрессирующих рекомбинантный рецептор CD8+ Т-клеток, включая все значения диапазонов. В некоторых вариантах осуществления вводят дозу клеток, составляющую, или составляющую примерно,  $1 \times 10^7$ ,  $2,5 \times 10^7$ ,  $5 \times 10^7$ ,  $7,5 \times 10^7$  или  $1 \times 10^8$  суммарных экспрессирующих рекомбинантный рецептор CD8+ Т-клеток.

[0511] В некоторых вариантах осуществления дозу клеток, например, экспрессирующих рекомбинантный рецептор Т-клеток, вводят субъекту в одной дозе или вводят только один раз в течение двух недель, одного месяца, трех месяцев, шести месяцев, 1 года или более.

[0512] В контексте адоптивной клеточной терапии введение конкретной «дозы» включает введение конкретного количества или числа клеток в виде одной композиции и/или одного непрерывного введения, например, одной инъекцией или непрерывной инфузией, и также включает введение конкретного количества или числа клеток в виде разделенной дозы или в виде множества композиций, предоставленных в нескольких отдельных композициях или инфузиях, в течение определенного периода времени, например, в течение не более 3 дней. Таким образом, в некоторых контекстах введение дозы представляет собой одно или непрерывное введение определенного количества клеток, которое производят или начинают в один момент времени. Однако в некоторых контекстах дозу вводят несколькими инъекциями или инфузиями в течение периода

времени не более трех дней, например, один раз в день в течение трех дней или в течение двух дней, или несколькими инфузиями в течение одного дня.

[0513] Таким образом, в некоторых аспектах клетки дозы вводят в одной фармацевтической композиции. В некоторых вариантах осуществления клетки дозы вводят в нескольких композициях, коллективно содержащих клетки дозы.

[0514] В некоторых вариантах осуществления термин «разделенная доза» означает дозу, которая разделена для введения ее в течение более чем одного дня. Такой вид дозирования охвачен настоящими способами, и считается введением одной дозы.

[0515] Таким образом, дозу клеток можно вводить в виде разделенной дозы, например, разделенной дозы, вводимой в течение определенного времени. Например, в некоторых вариантах осуществления дозу можно вводить субъекту в течение 2 дней или в течение 3 дней. Иллюстративные способы введения разделенных доз включают введение 25% дозы в первый день и введение остальных 75% дозы во второй день. В других вариантах осуществления 33% дозы можно вводить в первый день, и остальные 67% вводить 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 разделенную дозу не вводят в течение более чем 3 дней.

[0516] В некоторых вариантах осуществления клетки дозы можно вводить путем введения нескольких композиций, или растворов, например, первой и второй, необязательно, большего количества, каждая из которых содержит некоторое количество клеток дозы. В некоторых аспектах несколько 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 популяции, обогащенные  $CD8^+$  и  $CD4^+$  клетками, соответственно, например,  $CD4^+$  и/или  $CD8^+$  Т-клетками, индивидуально включающими клетки, генетически модифицированные для экспрессии рекомбинантного рецептора. В некоторых вариантах осуществления введение дозы включает введение первой композиции, содержащей дозу  $CD8^+$  Т-клеток или дозу  $CD4^+$  Т-клеток, и введение второй композиции, содержащей другую дозу  $CD4^+$  Т-клеток и  $CD8^+$  Т-клеток.

[0517] В некоторых вариантах осуществления введение композиции или дозы, например, введение нескольких клеточных композиций, включает отдельное введение клеточных композиций. В некоторых вариантах осуществления клеточные композиции представляют собой отдельные произведенные композиции, полученные способами, описанными в разделе I. В некоторых аспектах отдельное введение выполняют одновременно или последовательно, в любом порядке. В некоторых вариантах осуществления доза включает первую композицию и вторую композицию, и первую композицию и вторую композицию вводят с интервалом 0-12 часов, с интервалом 0-6 часов или с интервалом 0-2 часа. В некоторых вариантах осуществления начало введения первой композиции и начало введения второй композиции выполняют с интервалом не

более 2 часов, не более 1 часа или не более 30 минут, не более 15 минут, не более 10 минут или не более 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 более 2 часов, не более 1 часа или не более 30 минут, не более 15 минут, не более 10 минут или не более 5 минут.

[0518] В некоторых случаях первая композиция, например, первая композиция дозы, содержит CD4+ Т-клетки. В некоторых случаях первая композиция, например, первая композиция дозы, содержит CD8+ Т-клетки. В некоторых вариантах осуществления первую композицию вводят до введения второй композиции.

[0519] В некоторых вариантах осуществления доза, или композиция, клеток имеет определенное, или целевое, соотношение CD4+ клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор, и CD8+ клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор, и/или соотношение CD4+ клеток и CD8+ клеток, необязательно, составляющее примерно 1:1, или находящееся в диапазоне от примерно 1:3 до примерно 3:1, например, примерно 1:1. В некоторых аспектах введение композиции, или дозы, с целевым или желаемым соотношением разных клеточных популяций (например, соотношением CD4+:CD8+ или соотношением CAR+CD4+:CAR+CD8+, составляющим, например, 1:1) включает введение клеточной композиции, содержащей одну из популяций, с последующим введением отдельной клеточной композиции, содержащей другую из популяций, при этом введение проводят при, или при примерно, целевом или желаемом соотношении. В некоторых аспектах введение дозы, или композиции, клеток при определенном соотношении приводит к повышенному размножению, персистенции и/или противоопухолевой активности терапевтических Т-клеток.

[0520] В некоторых вариантах осуществления субъект получает несколько доз, например, две или более доз, или несколько последовательных доз, клеток. В некоторых вариантах осуществления субъекту вводят две дозы. В некоторых вариантах осуществления субъект получает следующую дозу, например, вторую дозу, введенную через примерно 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 несколько последовательных доз вводят после первой дозы, например, дополнительную дозу или дозы вводят после введения следующей дозы. В некоторых аспектах число клеток, вводимых субъекту в дополнительной дозе, является таким же, или аналогичным количеству в первой дозе и/или следующей дозе. В некоторых вариантах осуществления дополнительная доза или дозы превышают предшествующие дозы.

[0521] В некоторых аспектах размер первой и/или следующей дозы определяют на основании одного или более критериев, таких как ответ субъекта на предшествующее лечение, например, химиотерапию, болезненная нагрузка у субъекта, например, опухолевая нагрузка, масса, размер или величина, или степень, или тип метастазов, стадия заболевания и/или вероятность или частота случаев развития у субъекта токсических последствий, например, СВЦ, синдрома активации макрофагов, синдрома лизиса опухоли,

нейротоксичности и/или иммунного ответа хозяина против вводимых клеток и/или рекомбинантных рецепторов.

[0522] В некоторых аспектах период времени между введением первой дозы и введением следующей дозы составляет от примерно 9 до примерно 35 дней, от примерно 14 до примерно 28 дней или от 15 до 27 дней. В некоторых вариантах осуществления введение следующей дозы производят в момент времени не более чем через примерно 14 дней после, и менее чем примерно 28 дней после, введения первой дозы. В некоторых аспектах период времени между первой и следующей дозой составляет примерно 21 день. В некоторых вариантах осуществления дополнительную дозу или дозы, например, последующие дозы, вводят после введения следующей дозы. В некоторых аспектах дополнительную следующую дозу или дозы вводят через по меньшей мере примерно 14, и менее чем примерно 28, дней после введения предшествующей дозы. В некоторых вариантах осуществления дополнительную дозу вводят менее чем через примерно 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 дозы не вводят менее чем через примерно 14 дней после предшествующей дозы и/или дозы не вводят более чем через примерно 28 дней после предшествующей дозы.

[0523] В некоторых вариантах осуществления доза клеток, например, экспрессирующих рекомбинантный рецептор клеток, включает две дозы (например, двойную дозу), включающие первую дозу Т-клеток и следующую дозу Т-клеток, при этом введение одной или обеих из первой дозы и второй дозы представляет собой введение разделенной дозы Т-клеток.

[0524] В некоторых вариантах осуществления доза клеток, как правило, является достаточно большой для эффективного снижения болезненной нагрузки.

[0525] В некоторых вариантах осуществления клетки вводят в нужной дозировке, которая в некоторых аспектах включает нужную дозу или количество клеток или типа(ов) клеток и/или нужное соотношение типов клеток. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления дозировка клеток основана на общем количестве клеток (или количестве на кг массы тела) и на нужном соотношении отдельных популяций или подтипов, например, соотношении CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> клеток. В некоторых вариантах осуществления дозировка клеток основана на общем количестве (или количестве на кг массы тела) клеток в отдельных популяциях или клеток отдельных клеточных типов. В некоторых вариантах осуществления дозировка основана на сочетании таких признаков, как нужное количество всех клеток, нужное соотношение и нужное общее количество клеток в отдельных популяциях.

[0526] В некоторых вариантах осуществления популяции или подтипы клеток, например, CD8<sup>+</sup> и CD4<sup>+</sup> Т-клеток, вводят в нужной дозе, или в пределах допустимого отклонения от нужной дозы, суммарных клеток, например, в нужной дозе Т-клеток. В некоторых аспектах нужная доза представляет собой нужное количество клеток или нужное количество клеток на единицу массы тела субъекта, которому вводят клетки,

например, количество клеток/кг. В некоторых аспектах нужная доза составляет или превышает минимальное количество клеток или минимальное количество клеток на единицу массы тела. В некоторых аспектах в общем количестве клеток, вводимых в нужной дозе, отдельные популяции или подтипы присутствуют в нужном, или примерно нужном, окончательном соотношении (например, соотношении  $CD4^+$  и  $CD8^+$  клеток), например, в пределах определенного допустимого отклонения, или погрешности, от такого соотношения.

[0527] В некоторых вариантах осуществления клетки вводят в нужной дозе, или в пределах допустимого отклонения от нужной дозы, одной или более из отдельных популяций подтипов клеток, например, в нужной дозе  $CD4^+$  Т-клеток и/или нужной дозе  $CD8^+$  Т-клеток. В некоторых аспектах нужная доза представляет собой нужное количество клеток подтипа или популяции, или нужное количество таких клеток на единицу массы тела субъекта, которому вводят клетки, например, количество клеток/кг. В некоторых аспектах нужная доза составляет или превышает минимальное количество клеток популяции или подтипа, или минимальное количество клеток популяции или подтипа на единицу массы тела.

[0528] Таким образом, в некоторых вариантах осуществления дозировка основана на нужной фиксированной дозе суммарных клеток и нужном соотношении, и/или основана на нужной фиксированной дозе одного или более, например, каждого, из отдельных подтипов, или субпопуляций. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления дозировка основана на нужной фиксированной или минимальной дозе Т-клеток и нужном соотношении  $CD4^+$  и  $CD8^+$  Т-клеток, и/или основана на нужной фиксированной или минимальной дозе  $CD4^+$  и/или  $CD8^+$  Т-клеток.

[0529] В некоторых вариантах осуществления клетки вводят в нужном конечном соотношении, или в пределах допустимого диапазона нужного конечного соотношения, нескольких клеточных популяций или подтипов, например,  $CD4^+$  и  $CD8^+$  Т-клеток или подтипов. В некоторых аспектах нужное соотношение может представлять собой конкретное соотношение или может представлять собой диапазон соотношений. Например, в некоторых вариантах осуществления нужное соотношение (например, соотношение  $CD4^+$  и  $CD8^+$  Т-клеток) составляет от или от примерно 1:5 и до или до примерно 5:1 (или более примерно 1:5 и менее примерно 5:1), или от или от примерно 1:3 до или до примерно 3:1 (или более примерно 1:3 и менее примерно 3:1), например, от или от примерно 2:1 до или до примерно 1:5 (или более примерно 1:5 и менее примерно 2:1), например, составляет или составляет примерно 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 допустимое отклонение находится в пределах примерно 1%, примерно 2%, примерно 3%, примерно 4% примерно 5%, примерно 10%, примерно 15%, примерно 20%, примерно 25%, примерно 30%, примерно 35%, примерно 40%, примерно 45%, примерно 50% от нужного соотношения, включая любое значение в данных диапазонах. В конкретных вариантах



осуществления композиции обогащенных CD4+ Т-клеток и обогащенных CD8+ Т-клеток объединяют в нужном соотношении и вводят субъекту в виде одной клеточной композиции. В конкретном варианте осуществления композиции обогащенных CD4+ Т-клеток и обогащенных CD8+ Т-клеток вводят в виде отдельных композиций в нужном соотношении.

[0530] В конкретных вариантах осуществления количества и/или концентрации клеток относятся к количеству экспрессирующих рекомбинантный рецептор (например, CAR) клеток. В других вариантах осуществления количества и/или концентрации клеток относятся к количеству или концентрации всех вводимых клеток, Т-клеток или мононуклеарных клеток периферической крови (МКПК).

[0531] В некоторых аспектах размер дозы определяют на основании одного или более критериев, таких как ответ субъекта на предшествующее лечение, например, химиотерапию, болезненная нагрузка у субъекта, например, опухолевая нагрузка, масса, размер или величина, или степень, или тип метастазов, стадия заболевания и/или вероятность или частота случаев развития у субъекта токсических последствий, например, СВЦ, синдрома активации макрофагов, синдрома лизиса опухоли, нейротоксичности и/или иммунного ответа хозяина против вводимых клеток и/или рекомбинантных рецепторов.

[0532] В некоторых вариантах осуществления способы также включают введение одной или более дополнительных доз клеток, экспрессирующих химерный антигенный рецептор (CAR), и/или применение лимфодеплеции, и/или один или более этапов способов повторяют. 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, превышают ее, 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, превышают начальную дозу, или являются 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, ниже начальной дозы. В некоторых вариантах осуществления решение о введении одной или более дополнительных доз принимают на основании ответа субъекта на начальное лечение, или какое-либо предшествующее лечение, заболевания субъекта, например, на основании болезненной нагрузки у субъекта, например, опухолевой нагрузки, массы, размера или величины, или степени, или типа метастазов, стадии заболевания и/или вероятности или частоты случаев развития у субъекта токсических последствий, например, СВЦ, синдрома активации макрофагов, синдрома лизиса опухоли, нейротоксичности и/или иммунного ответа хозяина против вводимых клеток и/или рекомбинантных рецепторов.

## **VI. Изделия**

[0533] Также предложены изделия и наборы, включающие генетически модифицированные клетки, экспрессирующие рекомбинантный рецептор, полученные способами, предложенными в настоящем документе, такими как способы, описанные в

настоящем документе, например, в разделе I, например, произведенные композиции клеток, и, необязательно, инструкции по применению, например, инструкции по введению генетически модифицированных клеток субъекту, например, способами, описанными в настоящем документе, например, в разделе III.

[0534] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предложены изделия и/или наборы, включающие композицию, содержащую терапевтически эффективное количество любых из генетически модифицированных клеток, описанных в настоящем документе, и инструкции по введению их субъекту для лечения заболевания или состояния. В некоторых вариантах осуществления в инструкциях могут быть изложены некоторые, или все, из элементов способов введения клеток, предложенных в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления инструкции представляют собой конкретные инструкции по введению клеток для клеточной терапии, например, дозы, моменты времени, принцип отбора и/или идентификации субъектов для введения и условия введения. В некоторых вариантах осуществления изделия и/или наборы также включают средство для проведения лимфодеплеции и, необязательно, также включают инструкции по выполнению лимфодеплеции. В некоторых вариантах осуществления инструкции могут быть включены в виде наклейки или вкладыша в упаковку, совместно с композициями для введения.

[0535] В некоторых вариантах осуществления изделие может включать контейнер, необязательно, флакон, содержащий композицию обогащенных CD4<sup>+</sup> Т-клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор. В некоторых вариантах осуществления изделие или набор, необязательно, включает второй контейнер, необязательно, второй флакон, содержащий композицию обогащенных CD8<sup>+</sup> Т-клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор. В некоторых вариантах осуществления к клеткам добавлен криопротектор. В некоторых аспектах контейнер представляет собой флакон или мешок. В некоторых вариантах осуществления контейнер содержит композицию обогащенных CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-клеток.

[0536] В некоторых вариантах осуществления композиция обогащенных CD4<sup>+</sup> Т-клеток в контейнере содержит 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 примерно 100% CD4<sup>+</sup> 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 примерно 100% CD4<sup>+</sup> Т-клеток, которые экспрессируют рекомбинантный рецептор и/или были трансдуцированы или трансфицированы рекомбинантным полинуклеотидом. В конкретных вариантах осуществления композиция

обогащенных CD4+ Т-клеток в контейнере содержит менее 40%, менее 35%, менее 30%, менее 25%, менее 20%, менее 15%, менее 10%, менее 5%, менее 1%, менее 0,1% или менее 0,01% CD8+ Т-клеток, и/или не содержит CD8+ Т-клетки, и/или свободна, или практически свободна, от CD8+ Т-клеток.

[0537] В некоторых вариантах осуществления композиция обогащенных CD8+ Т-клеток в контейнере содержит 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 примерно 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 примерно 100% CD8+ Т-клеток, которые экспрессируют рекомбинантный рецептор и/или были трансдуцированы или трансфицированы рекомбинантным полинуклеотидом. В конкретных вариантах осуществления произведенная композиция обогащенных CD8+ Т-клеток, которую вводят субъекту, содержит менее 40%, менее 35%, менее 30%, менее 25%, менее 20%, менее 15%, менее 10%, менее 5%, менее 1%, менее 0,1% или менее 0,01% CD4+ Т-клеток, и/или не содержит CD4+ Т-клетки, и/или свободна, или практически свободна, от CD4+ Т-клеток.

[0538] В некоторых вариантах осуществления в инструкциях указана доза клеток, которая должна быть введена. Например, в некоторых вариантах осуществления доза, указанная в инструкциях, включает общее количество экспрессирующих рекомбинантный рецептор (например, CAR) клеток от примерно  $1 \times 10^6$  до  $3 \times 10^8$ , например, в диапазоне от примерно  $1 \times 10^7$  до  $2 \times 10^8$  таких клеток, например, всего  $1 \times 10^7$ ,  $5 \times 10^7$ ,  $1 \times 10^8$  или  $1,5 \times 10^8$  таких клеток, или в диапазоне между любыми двумя из приведенных выше значений. В некоторых вариантах осуществления пациенту вводят несколько доз, и каждая из доз или суммарная доза может находиться в пределах любых из приведенных выше значений.

[0539] В некоторых вариантах осуществления контейнер, такой как флакон, содержит более или более примерно  $10 \times 10^6$  Т-клеток или экспрессирующих рекомбинантный рецептор Т-клеток, более или более примерно  $15 \times 10^6$  Т-клеток или экспрессирующих рекомбинантный рецептор Т-клеток, более или более примерно  $25 \times 10^6$  Т-клеток или экспрессирующих рекомбинантный рецептор Т-клеток. В некоторых аспектах флакон содержит от примерно 10 миллионов клеток в мл до примерно 70 миллионов клеток в мл, от примерно 10 миллионов клеток в мл до примерно 50 миллионов клеток в мл, от примерно 10 миллионов клеток в мл до примерно 25 миллионов клеток в мл, от примерно 10 миллионов клеток в мл до примерно 15 миллионов клеток в мл, от примерно 15 миллионов клеток в мл до примерно 70 миллионов клеток в мл, от примерно 15 миллионов клеток в мл до примерно 50 миллионов клеток в мл, от примерно 15 миллионов клеток в мл до примерно 25 миллионов клеток в мл.

миллионов клеток в мл, от примерно 25 миллионов клеток в мл до примерно 70 миллионов клеток в мл, от примерно 25 миллионов клеток в мл до примерно 50 миллионов клеток в мл и от примерно 50 миллионов клеток в мл до примерно 70 миллионов клеток в мл.

[0540] В некоторых вариантах осуществления несколько флаконов или несколько клеток, или стандартная доза клеток, предназначенных для введения, в совокупности составляют дозу клеток, содержащую от или от примерно  $1 \times 10^5$  до  $5 \times 10^8$  суммарных экспрессирующих рекомбинантный рецептор Т-клеток или суммарных Т-клеток, от  $1 \times 10^5$  до  $1 \times 10^8$  суммарных экспрессирующих рекомбинантный рецептор Т-клеток или суммарных Т-клеток, от или от примерно  $5 \times 10^5$  до  $1 \times 10^7$  суммарных экспрессирующих рекомбинантный рецептор Т-клеток или суммарных Т-клеток, или от или от примерно  $1 \times 10^6$  до  $1 \times 10^7$  суммарных экспрессирующих рекомбинантный рецептор Т-клеток или суммарных Т-клеток, в каждом случае включительно. В некоторых аспектах изделие включает одну или более стандартных доз  $CD4^+$  и  $CD8^+$  Т-клеток или  $CD4^+$  рецептор+ Т-клеток и  $CD8^+$  рецептор+ Т-клеток, при этом стандартная доза содержит от или от примерно  $1 \times 10^7$  до или до примерно  $2 \times 10^8$  экспрессирующих рекомбинантный рецептор Т-клеток, от или от примерно  $5 \times 10^7$  до или до примерно  $1,5 \times 10^8$  экспрессирующих рекомбинантный рецептор Т-клеток, содержит или содержит примерно  $5 \times 10^7$  экспрессирующих рекомбинантный рецептор Т-клеток, содержит или содержит примерно  $1 \times 10^8$  экспрессирующих рекомбинантный рецептор Т-клеток, или содержит или содержит примерно  $1,5 \times 10^8$  экспрессирующих рекомбинантный рецептор Т-клеток, необязательно, при этом информация, предоставленная с изделием, предписывает введение одной или нескольких стандартных доз и/или объема, соответствующего такой одной или нескольким стандартным дозам. В некоторых случаях изделие включает одну или более стандартных доз  $CD8^+$  Т-клеток, при этом доза содержит от или от примерно  $5 \times 10^6$  до или до примерно  $1 \times 10^8$  экспрессирующих рекомбинантный рецептор  $CD8^+$  Т-клеток, доза содержит от или от примерно  $1 \times 10^7$  и до или до примерно  $0,75 \times 10^8$  экспрессирующих рекомбинантный рецептор  $CD8^+$  Т-клеток, доза содержит или содержит примерно  $2,5 \times 10^7$  экспрессирующих рекомбинантный рецептор  $CD8^+$  Т-клеток, или доза содержит или содержит примерно  $5 \times 10^7$  экспрессирующих рекомбинантный рецептор  $CD8^+$  Т-клеток, или доза содержит или содержит примерно  $0,75 \times 10^8$  экспрессирующих рекомбинантный рецептор  $CD8^+$  Т-клеток, необязательно, при этом информация, предоставленная с изделием, предписывает введение одной или нескольких стандартных доз и/или объема, соответствующего такой одной или нескольким стандартным дозам. В некоторых вариантах осуществления клетки в изделии коллективно составляют дозу клеток, содержащую не более  $1 \times 10^8$  суммарных экспрессирующих рекомбинантный рецептор Т-клеток или суммарных Т-клеток, не более  $1 \times 10^7$  суммарных экспрессирующих рекомбинантный рецептор Т-клеток или суммарных Т-клеток, не более  $0,5 \times 10^7$  суммарных экспрессирующих рекомбинантный рецептор Т-клеток или суммарных Т-клеток, не более  $1 \times 10^6$  суммарных экспрессирующих рекомбинантный рецептор Т-клеток

или суммарных Т-клеток, не более  $0,5 \times 10^6$  суммарных экспрессирующих рекомбинантный рецептор Т-клеток или суммарных Т-клеток.

[0541] В некоторых вариантах осуществления в инструкциях может быть указан режим дозирования и время введения. Например, в некоторых вариантах осуществления инструкции могут предписывать введение субъекту нескольких доз, например, двух или более доз, клеток. В некоторых вариантах осуществления в инструкциях конкретно указано время введения нескольких доз, например, что вторую дозу следует вводить примерно через 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 или 21 дней после первой дозы; и/или количество дозы в каждой дозе.

[0542] В некоторых вариантах осуществления изделие или набор включает композицию обогащенных CD4<sup>+</sup> Т-клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор, и инструкции по введению субъекту, имеющему заболевание или состояние, всей или части композиции обогащенных CD4<sup>+</sup> Т-клеток и дополнительному введению CD8<sup>+</sup> Т-клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор. В некоторых вариантах осуществления инструкции предписывают введение CD4<sup>+</sup> Т-клеток до введения CD8<sup>+</sup> Т-клеток. В некоторых случаях инструкции предписывают введение CD8<sup>+</sup> Т-клеток до введения CD4<sup>+</sup> Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления изделие или набор включает множество CD8<sup>+</sup> Т-клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор, и инструкции по введению субъекту, имеющему заболевание или состояние, всего или части множества CD8<sup>+</sup> Т-клеток и CD4<sup>+</sup> Т-клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор. В некоторых вариантах осуществления в инструкциях указан режим дозирования и время введения клеток.

[0543] В некоторых аспектах инструкции предписывают введение всех или части CD4<sup>+</sup> Т-клеток и всех или части CD8<sup>+</sup> Т-клеток с интервалом 0-12 часов, 0-6 часов или 0-2 часа. В некоторых случаях инструкции предписывают введение CD4<sup>+</sup> Т-клеток и CD8<sup>+</sup> Т-клеток с интервалом не более 2 часов, не более 1 часа, не более 30 минут, не более 15 минут, не более 10 минут или не более 5 минут.

[0544] В некоторых вариантах осуществления в инструкциях указана доза или количество клеток, или типов клеток и/или соотношение типов клеток, например, отдельных популяций или подтипов, например, соотношение CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> клеток. В некоторых вариантах осуществления популяции или подтипы клеток представляют собой, например, CD8<sup>+</sup> и CD4<sup>+</sup> Т-клетки. Например, в некоторых вариантах осуществления в инструкциях указано, что клетки вводят в нужном конечном соотношении, или в пределах допустимого диапазона нужного конечного соотношения, нескольких клеточных популяций или подтипов, например, CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-клеток или подтипов, составляющем от или примерно 1:5 до или до примерно 5:1 (или более примерно 1:5 и менее примерно 5:1), или от или от примерно 1:3 до или до примерно 3:1 (или более примерно 1:3 и менее примерно 3:1), например, от или от примерно 2:1 до или до примерно 1:5 (или более примерно 1:5 и менее примерно 2:1), например, составляющем или составляющем примерно 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 конкретных вариантах осуществления в инструкциях указано, что композиции обогащенных CD4+ Т-клеток и обогащенных CD8+ Т-клеток объединяют в нужном соотношении и вводят субъекту в виде одной клеточной композиции. В конкретных вариантах осуществления в инструкциях указано, что композиции обогащенных CD4+ Т-клеток и обогащенных CD8+ Т-клеток вводят в виде отдельных композиций в нужном соотношении. В некоторых аспектах допустимое отклонение находится в пределах примерно 1%, примерно 2%, примерно 3%, примерно 4% примерно 5%, примерно 10%, примерно 15%, примерно 20%, примерно 25%, примерно 30%, примерно 35%, примерно 40%, примерно 45%, примерно 50% от нужного соотношения, включая любое значение в данных диапазонах.

### **VII. Определения**

[0545] Если нет иных указаний, все относящиеся к данной области термины, системы обозначений и другие технические и научные термины или терминология, используемые в настоящем документе, должны иметь то же значение, которое им обычно придают специалисты в области, к которой относится заявленный объект изобретения. В некоторых случаях термины с общепринятыми значениями определены в настоящем документе для ясности и/или для доступной ссылки, и включение таких определений в настоящий документ не обязательно должно означать их существенное отличие от общепринятых в данной области определений.

[0546] Термины «полипептид» и «белок» используются взаимозаменяемо и означают полимер из аминокислотных остатков, без ограничения по минимальной длине. Полипептиды, включая предложенные рецепторы и другие полипептиды, например, линкеры или пептиды, могут содержать аминокислотные остатки, включая природные и/или неприродные аминокислотные остатки. Термины также охватывают модификации полипептида после экспрессии, например, гликозилирование, сиалилирование, ацетилирование и фосфорилирование. В некоторых аспектах полипептиды могут иметь модификации относительно природной или естественной последовательности при условии, что белок сохраняет нужную активность. Эти модификации могут быть намеренными, например, вследствие сайт-направленного мутагенеза, или могут быть случайными, например, вследствие мутаций в организме хозяев, продуцирующих белки, или ошибок вследствие ПЦР-амплификации.

[0547] Используемый в настоящем документе термин «субъект» относится к млекопитающему, такому как человек или другое животное, и, как правило, относится к человеку. В некоторых вариантах осуществления субъект, например, пациент, которому вводят средство или средства, клетки, клеточные популяции или композиции, является млекопитающим, как правило, приматом, таким как человек. В некоторых вариантах осуществления примат является обезьяной или человекообразной обезьяной. Субъект может быть мужчиной или женщиной, и может иметь любой возраст, включая младенца, ребенка, подростка, взрослого или пожилого субъектов. В некоторых вариантах

осуществления субъект является млекопитающим, отличным от приматов, например, грызуном.

[0548] Используемый в настоящем документе термин «лечение» (и его грамматические вариации, такие как «лечить» или «лечебный») означает полное или частичное облегчение или ослабление заболевания или состояния, или нарушения, или симптома, неблагоприятного эффекта или исхода, или связанного с ними фенотипа. Желаемые эффекты лечения включают, но без ограничения, предотвращение развития или рецидива заболевания, ослабление симптомов, уменьшение любых прямых или косвенных патологических последствий заболевания, предотвращение метастазирования, уменьшение скорости прогрессирования заболевания, ослабление или временное облегчение болезненного состояния, а также ремиссию или более благоприятный прогноз. Термины не подразумевают полное исцеление заболевания или полное устранение любого симптома, или эффект(ы) на все симптомы или исходы.

[0549] При использовании в настоящем документе «отсрочка развития заболевания» означает откладывание, создание препятствия, замедление, торможение, стабилизацию, подавление и/или отсрочку развития заболевания (такого как рак). Эта отсрочка может иметь различную протяженность во времени, в зависимости от истории заболевания и/или получающего лечение индивидуума. В некоторых вариантах осуществления достаточная или значительная отсрочка может, по сути, включать предотвращение, поскольку у индивидуума не развивается заболевание. Например, поздняя стадия рака, такая как развитие метастазов, может быть отсрочена.

[0550] Используемый в настоящем документе термин «предотвращение» включает обеспечение профилактики в отношении развития или рецидива заболевания у субъекта, который может быть предрасположен к заболеванию, но заболевание у него еще не было диагностировано. В некоторых вариантах осуществления предложенные клетки и композиции используют для отсрочки развития заболевания или замедления прогрессирования заболевания.

[0551] Используемый в настоящем документе термин «подавление» функции или активности означает ослабление функции или активности относительно в остальном таких же условий, за исключением интересующего условия или параметра, или, альтернативно, относительно другого состояния. Например, клетки, подавляющие рост опухоли, уменьшают скорость роста опухоли в сравнении со скоростью роста опухоли в отсутствие клеток.

[0552] «Эффективное количество» средства, например, фармацевтического препарата, клеток или композиции, в контексте введения означает количество, эффективное, в необходимых дозах/количествах и в течение необходимых периодов времени, для достижения желаемого результата, такого как терапевтический или профилактический результат.

[0553] «Терапевтически эффективное количество» средства, например, фармацевтического препарата или генетически модифицированных клеток, означает

количество, эффективное, в необходимых дозах и в течение необходимых периодов времени, для достижения желаемого терапевтического результата, например, для лечения заболевания, состояния или нарушения, и/или фармакокинетического или фармакодинамического эффекта лечения. Терапевтически эффективное количество может варьироваться в зависимости от таких факторов, как болезненное состояние, возраст, пол и масса тела субъекта, а также вводимые иммуномодулирующие полипептиды или генетически модифицированные клетки. В некоторых вариантах осуществления предложенные способы включают введение иммуномодулирующих полипептидов, генетически модифицированных клеток или композиций в эффективных количествах, например, терапевтически эффективных количествах.

[0554] «Профилактически эффективное количество» означает количество, эффективное, в необходимых дозах и в течение необходимых периодов времени, для достижения желаемого профилактического результата. Как правило, но не обязательно, поскольку профилактическую дозу используют для субъектов до развития, или на ранней стадии развития, заболевания, профилактически эффективное количество будет меньшим, чем терапевтически эффективное количество. В контексте снижения опухолевой нагрузки профилактически эффективное количество в некоторых аспектах будет выше, чем терапевтически эффективное количество.

[0555] Используемый в настоящем документе термин «примерно» относится к обычному диапазону погрешности для соответствующего значения, хорошо известному специалистам в данной области. В настоящем документе использование термина «примерно» применительно к значению или параметру включает (и описывает) варианты осуществления, которые направлены на это значение или параметр как таковые.

[0556] При использовании в настоящем документе форма единственного числа существительных включает соответствующую форму множественного числа, если из контекста явно не следует иное. Например, «один» означает «по меньшей мере один» или «один или более».

[0557] В тексте настоящей заявки различные аспекты заявленного объекта изобретения представлены в формате диапазона. Следует понимать, что описание в формате диапазона использовано исключительно для удобства и краткости, и не должно восприниматься как негибкое ограничение объема заявленного объекта изобретения. Соответственно, описание диапазона следует понимать, как специально раскрывающее все возможные поддиапазоны, а также отдельные числовые значения в данном диапазоне. Например, если указан диапазон значений, понятно, что каждое промежуточное значение между верхним и нижним пределом данного диапазона, а также любое другое заявленное или промежуточное значение в данном указанном диапазоне, входит в объем заявленного объекта изобретения. Верхние и нижние пределы этих меньших по размеру диапазонов могут независимо быть включены в меньшие диапазоны, и также входят в объем заявленного объекта изобретения, с учетом любого специально исключенного предела в заявленном диапазоне. Если указанный диапазон включает одно или оба из этих пределов,



диапазоны, исключаящие один или оба из этих включенных пределов, также включены в заявленный объект изобретения. Это правило применимо независимо от широты диапазона.

[0558] В настоящем документе «композиция» означает любую смесь двух или более продуктов, веществ или соединений, включая клетки. Она может представлять собой раствор, суспензию, жидкость, порошок, пасту, водный, не водный состав или любое их сочетание.

[0559] Используемый в настоящем документе термин «обогащение» применительно к одному или более конкретным типам клеток, или популяциям клеток, означает увеличение количества или процентного содержания типа или популяции клеток, например, относительно общего количества клеток в, или в объеме, композиции, или относительно клеток других типов, например, в результате положительной селекции на основе маркеров, экспрессируемых популяцией или клеткой, или в результате отрицательной селекции на основе маркера, не присутствующего в клеточной популяции или клетке, которая должна быть истощена. Термин не означает полное удаление других клеток, типов или популяций клеток, из композиции и не означает, что клетки, обогащенные таким образом, присутствуют в количестве 100%, или даже примерно 100%, в обогащенной композиции.

[0560] В настоящем документе заявление, что клетка или популяция клеток является «положительной» по конкретному маркеру, означает поддающееся обнаружению наличие на, или в, клетке конкретного маркера, как правило, поверхностного маркера. При ссылке на поверхностный маркер термин означает наличие экспрессии маркера на поверхности, что определяют методом проточной цитометрии, например, путем окрашивания антителом, которое специфически связывает маркер, и обнаружения указанного антитела, при этом окрашивание может быть обнаружено методом проточной цитометрии на уровне, существенно превышающем уровень окрашивания, определяемый при проведении такой же процедуры с изотипическим контролем, или с заданным контролем определения флуоресценции с комбинацией детектируемых меток без одной (FMO), при в остальном идентичных условиях, и/или на уровне, практически аналогичном уровню для клетки, которая, как известно, содержит данный маркер, и/или на уровне, существенно превышающем уровень для клетки, которая, как известно, не содержит данный маркер.

[0561] В настоящем документе заявление, что клетка или популяция клеток является «отрицательной» по конкретному маркеру, означает отсутствие значительного поддающегося обнаружению наличия на, или в, клетке конкретного маркера, как правило, поверхностного маркера. При ссылке на поверхностный маркер термин означает отсутствие экспрессии маркера на поверхности, что определяют методом проточной цитометрии, например, путем окрашивания антителом, которое специфически связывает маркер, и обнаружения указанного антитела, при этом окрашивание не может быть обнаружено методом проточной цитометрии на уровне, существенно превышающем

уровень окрашивания, определяемый при проведении такой же процедуры с изотипическим контролем, или с заданным контролем определения флуоресценции с комбинацией детектируемых меток без одной (FMO), при в остальном идентичных условиях, и/или на уровне, значительно более низком, чем уровень для клетки, которая, как известно, содержит данный маркер, и/или на уровне, практически аналогичном уровню для клетки, которая, как известно, не содержит маркер.

[0562] Используемый в настоящем документе термин «вектор» означает молекулу нуклеиновой кислоты, способную распространять другую нуклеиновую кислоту, с которой она связана. Термин включает вектор в качестве структуры самореплицируемой нуклеиновой кислоты, а также вектор, встроенный в геном клетки-хозяина, в которую он был введен. Некоторые векторы способны управлять экспрессией нуклеиновых кислот, с которыми они функционально связаны. В настоящем документе такие векторы называют «экспрессионными векторами».

### **VIII. Иллюстративные варианты осуществления**

В число предлагаемых вариантов осуществления входят следующие:

1. Способ получения композиции генетически модифицированных клеток, включающий культивирование в присутствии средства, ингибирующего активность mTOR, композиции генетически модифицированных клеток, содержащей первичные человеческие Т-клетки, включающие клетки, генетически модифицированные рекомбинантным рецептором, при этом клетки в композиции не подвергались воздействию средства до культивирования; и

при этом способ приводит к пролиферации или размножению клеток в композиции, с получением произведенной композиции, содержащей генетически модифицированные Т-клетки.

2. Способ по варианту осуществления 1, при этом первичные Т-клетки представляют собой CD4<sup>+</sup> и/или CD8<sup>+</sup> Т-клетки.

3. Способ по варианту осуществления 1 или 2, при этом композиция генетически модифицированных Т-клеток содержит обогащенные CD4<sup>+</sup> Т-клетки.

4. Способ по варианту осуществления 1 или 2, при этом композиция генетически модифицированных Т-клеток содержит обогащенные CD8<sup>+</sup> Т-клетки.

5. Способ получения композиции генетически модифицированных клеток, включающий культивирование в присутствии средства, ингибирующего активность mTOR, композиции генетически модифицированных клеток, содержащей обогащенные CD4<sup>+</sup> и/или обогащенные CD8<sup>+</sup> первичные человеческие Т-клетки, включающие Т-клетки, генетически модифицированные рекомбинантным рецептором;

при этом способ приводит к пролиферации или размножению клеток в композиции, с получением произведенной композиции, содержащей генетически модифицированные обогащенные CD4<sup>+</sup> или обогащенные CD8<sup>+</sup> Т-клетки.

6. Способ по любому из вариантов осуществления 2, 3 или 5, при этом композиция генетически модифицированных Т-клеток содержит более или более примерно 70%, более

или более примерно 75%, более или более примерно 80%, более или более примерно 85%, более или более примерно 90%, более или более примерно 95%, или более или более примерно 98% CD4+ первичных человеческих Т-клеток; и/или

исходная композиция состоит в основном из CD4+ первичных человеческих Т-клеток.

7. Способ по любому из вариантов осуществления 2, 4 или 5, при этом композиция генетически модифицированных Т-клеток содержит более или более примерно 70%, более или более примерно 75%, более или более примерно 80%, более или более примерно 85%, более или более примерно 90%, более или более примерно 95%, или более или более примерно 98% CD8+ первичных человеческих Т-клеток; и/или

исходная композиция состоит в основном из CD8+ первичных человеческих Т-клеток.

8. Способ по любому из вариантов осуществления 2-5, при этом композиция генетически модифицированных Т-клеток содержит более или более примерно 70%, более или более примерно 75%, более или более примерно 80%, более или более примерно 85%, более или более примерно 90%, более или более примерно 95%, или более или более примерно 98% CD4+ и CD8+ первичных человеческих Т-клетки; и/или

исходная композиция состоит в основном из CD4+ и CD8+ первичных человеческих Т-клеток.

9. Способ по любому из вариантов осуществления 1-8, при этом культивирование проводят в присутствии одного или более цитокинов, необязательно, при этом один или более цитокинов включают один или более из IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-12, IL-15, G-CSF и GM-CSF, необязательно, при этом один или более цитокинов включают IL-2, IL-7 или IL-15.

10. Способ по варианту осуществления 9, при этом один или более цитокинов представляют собой рекомбинантные цитокины.

11. Способ по любому из вариантов осуществления 1-10, при этом до культивирования способ дополнительно включает:

(а) инкубирование в стимулирующих условиях исходной композиции, содержащей первичные Т-клетки, при этом указанные стимулирующие условия включают присутствие 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, с получением стимулированной композиции; и

(b) введение рекомбинантного рецептора в стимулированную композицию, с получением генетически модифицированной композиции, содержащей генетически модифицированные Т-клетки.

12. Способ по варианту осуществления 11, при этом исходная композиция, стимулированная композиция и/или генетически модифицированная композиция содержит первичные CD4+ и/или CD8+ Т-клетки.

13. Способ по варианту осуществления 11 или 12, при этом исходная композиция, стимулированная композиция и/или генетически модифицированная композиция содержит обогащенные CD4+ Т-клетки.

14. Способ по варианту осуществления 11 или 12, при этом исходная композиция, стимулированная композиция и/или генетически модифицированная композиция содержит обогащенные CD8+ Т-клетки.

15. Способ получения композиции генетически модифицированных клеток, включающий:

(а) инкубирование в стимулирующих условиях исходной композиции, содержащей Т-клетки, обогащенные по CD4+ и/или CD8+ первичным человеческим Т-клеткам, при этом 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) средства, ингибирующего активность mTOR; и

(b) введение рекомбинантного рецептора в стимулированную композицию, с получением генетически модифицированной композиции, содержащей генетически модифицированные Т-клетки.

16. Способ по любому из вариантов осуществления 12, 13 и 15, при этом исходная композиция, стимулированная композиция и/или генетически модифицированная композиция содержит более или более примерно 70%, более или более примерно 75%, более или более примерно 80%, более или более примерно 85%, более или более примерно 90%, более или более примерно 95%, или более или более примерно 98% CD4+ первичных человеческих Т-клеток; и/или

исходная композиция состоит в основном из CD4+ первичных человеческих Т-клеток.

17. Способ по любому из вариантов осуществления 12, 14 или 15, при этом исходная композиция, стимулированная композиция и/или генетически модифицированная композиция содержит более или более примерно 70%, более или более примерно 75%, более или более примерно 80%, более или более примерно 85%, более или более примерно 90%, более или более примерно 95%, или более или более примерно 98% CD8+ первичных человеческих Т-клеток; и/или

исходная композиция состоит в основном из CD8+ первичных человеческих Т-клеток.

18. Способ по любому из вариантов осуществления 12-15, при этом исходная композиция, стимулированная композиция и/или генетически модифицированная композиция содержит более или более примерно 70%, более или более примерно 75%, более или более примерно 80%, более или более примерно 85%, более или более примерно 90%, более или более примерно 95%, или более или более примерно 98% CD4+ и CD8+ первичных человеческих Т-клеток; и/или

исходная композиция состоит в основном из CD4+ и CD8+ первичных человеческих Т-клеток.

19. Способ по любому из вариантов осуществления 1-18, при этом средство, ингибирующее активность mTOR, представляет собой малую молекулу, малую органическую молекулу, полинуклеотид, олигонуклеотид, кнРНК или полипептид, необязательно, при этом средство, ингибирующее активность mTOR, представляет собой малую органическую молекулу.

20. Способ по любому из вариантов осуществления 1-19, при этом средство, ингибирующее активность mTOR, ингибирует активность киназы mTORC1 и/или mTORC2.

21. Способ по любому из вариантов осуществления 1-19, при этом средство, ингибирующее активность mTOR, ингибирует активность по меньшей мере одной дополнительной киназы, необязательно, при этом по меньшей мере одна дополнительная киназа представляет собой PI3K.

22. Способ по любому из вариантов осуществления 19-21, при этом средство, ингибирующее активность mTOR, представляет собой BEZ235, BGT226, GDC0980, NVP-BEZ235, PF-04691502, PI103, SAR245409, SF1126, VS5584 или XL765.

23. Способ по любому из вариантов осуществления 1-19, при этом средство, ингибирующее активность mTOR:

(i) не ингибирует активность PI3K;

(ii) заметно не ингибирует активность PI3K при  $IC_{50}$  для активности mTOR; и/или

(iii) заметно не ингибирует PI3K при всех концентрациях, заметно ингибирующих активность mTOR.

24. Способ по любому из вариантов осуществления 1-19 или 23, при этом средство, ингибирующее активность mTOR, ингибирует активность киназы mTORC1 и mTORC2.

25. Способ по любому из вариантов осуществления 1-19, 23 или 24, при этом средство, ингибирующее активность mTOR, представляет собой пиразолопиримидин, торин 1, торкиниб, PP30, Ku-0063794, WAY-600 (Wyeth), WAY-687 (Wyeth), WAY-354 (Wyeth), OSI-027, DS3078a или AZD8055.

26. Способ по любому из вариантов осуществления 1-19, при этом средство, ингибирующее активность mTOR, избирательно ингибирует активность mTORC1.

27. Способ по варианту осуществления 26, при этом средство, ингибирующее активность mTOR:

(i) не ингибирует активность mTORC2;

(ii) заметно не ингибирует активность mTORC2 при  $IC_{50}$  для активности mTORC1;

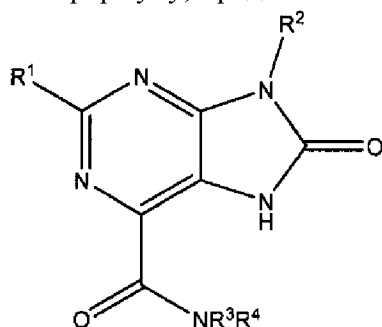
и/или

(iii) заметно не ингибирует mTORC2 при всех концентрациях, заметно ингибирующих активность mTORC1.

28. Способ по варианту осуществления 26 или 27, при этом средство, ингибирующее активность mTOR, представляет собой рапамицин, темсиролимус,

эверолимус, дефоролимус или AZD8055.

29. Способ по любому из вариантов осуществления 1-19, 23 или 24, при этом средство имеет формулу, представленную формулой I,



Формула (I)

где  $R^1$  представляет собой замещенный или незамещенный  $C_{1-8}$  алкил, замещенный или незамещенный арил, замещенный или незамещенный гетероарил, замещенный или незамещенный циклоалкил, или замещенный или незамещенный гетероциклоалкил,

$R^2$  представляет собой замещенный или незамещенный  $C_{1-8}$  алкил, замещенный или незамещенный арил, замещенный или незамещенный гетероарил, замещенный или незамещенный циклоалкил, или замещенный или незамещенный гетероциклоалкил, и

$R^3$  и  $R^4$  независимо представляют собой H или  $C_{1-8}$  алкил.

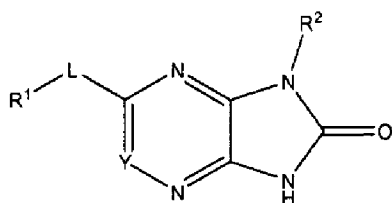
30. Способ по варианту осуществления 29, при этом  $R^1$  представляет собой замещенный арил, замещенный или незамещенный гетероарил, такой как замещенный фенил.

31. Способ по варианту осуществления 29 или 30, при этом  $R^2$  представляет собой замещенный или незамещенный арил, и/или замещенный или незамещенный фенил.

32. Способ по любому из вариантов осуществления 29-31, при этом группы, которые являются замещенными, замещены одним или более из групп галогена;  $C_{1-8}$  алкила;  $C_{2-8}$  алкенила;  $C_{2-8}$  алкинила; гидроксила;  $C_{1-8}$  алкоксила; амино; нитро; тиола; тиоэфира; имина; циано; амидо; фосфонато; фосфина; карбоксила; тиокарбонила; сульфонила; сульфонамида; кетона; альдегида; сложного эфира; карбонила; галоалкила;  $B(OH)_2$ ; карбоциклического циклоалкила, гетероциклоалкила, моноциклического или конденсированного, или не конденсированного полициклического арила или гетероарила; амино; O-низшего алкила; O-арила, арила; арила-низшего алкила;  $CO_2CH_3$ ;  $CONH_2$ ;  $OCH_2CONH_2$ ;  $NH_2$ ;  $SO_2NH_2$ ;  $OCHF_2$ ;  $CF_3$  или  $OCF_3$ .

33. Способ по любому из вариантов осуществления 1-19, 23, 24 или 29-32, при этом средство, ингибирующее активность mTOR, представляет собой соединение 63.

34. Способ по любому из вариантов осуществления 1-19, 23 или 24, при этом средство имеет формулу, представленную формулой (II),



Формула (II)

где L представляет собой простую связь, NH или O,

Y представляет собой N или CR<sup>3</sup>,

при этом R<sup>1</sup> представляет собой H, замещенный или незамещенный C<sub>1-8</sub> алкил, замещенный или незамещенный C<sub>2-8</sub> алкенил, замещенный или незамещенный арил, замещенный или незамещенный гетероарил, замещенный или незамещенный циклоалкил, или замещенный или незамещенный гетероциклоалкил,

R<sup>2</sup> представляет собой H, замещенный или незамещенный C<sub>1-8</sub> алкил, замещенный или незамещенный арил, замещенный или незамещенный гетероарил, замещенный или незамещенный циклоалкил, или замещенный или незамещенный гетероциклоалкил,

R<sup>3</sup> представляет собой H, замещенный или незамещенный C<sub>1-8</sub> алкил, замещенный или незамещенный арил, замещенный или незамещенный гетероарил, замещенный или незамещенный циклоалкил, замещенный или незамещенный гетероциклоалкил, -NHR<sup>4</sup> или -N(R<sup>4</sup>)<sub>2</sub>, и

R<sup>4</sup> в каждом случае независимо представляет собой замещенный или незамещенный C<sub>1-8</sub> алкил, замещенный или незамещенный арил, замещенный или незамещенный гетероарил, замещенный или незамещенный циклоалкил, или замещенный или незамещенный гетероциклоалкил.

35. Способ по варианту осуществления 34, при этом R<sup>1</sup> представляет собой замещенный арил и/или замещенный фенил.

36. Способ по варианту осуществления 34 или 35, при этом Y представляет собой СН.

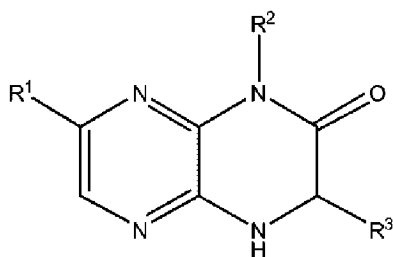
37. Способ по любому из вариантов осуществления 34-36, при этом L представляет собой простую связь.

38. Способ по любому из вариантов осуществления 34-37, при этом R<sup>1</sup> представляет собой замещенный арил, и R<sup>2</sup> представляет собой C<sub>1-8</sub> алкил, замещенный одним или более заместителями, выбранными из алкокси, амина, гидрокси, циклоалкила или гетероциклоалкила.

39. Способ по варианту осуществления 38, при этом R<sup>2</sup> представляет собой C<sub>1-8</sub> алкил, замещенный гетероциклоалкилом.

40. Способ по любому из вариантов осуществления 1-19, 23, 24 или 34-39, при этом средство, ингибирующее активность mTOR, представляет собой соединение 155.

41. Способ по любому из вариантов осуществления 1-19, 23 или 24, при этом средство имеет формулу, представленную формулой III



Формула (III)

где  $R^1$  представляет собой замещенный или незамещенный  $C_{1-8}$  алкил, замещенный или незамещенный арил, замещенный или незамещенный циклоалкил, замещенный или незамещенный гетероцикл, или замещенный или незамещенный гетероциклилалкил,

$R^2$  представляет собой H, замещенный или незамещенный  $C_{1-8}$  алкил, замещенный или незамещенный циклоалкил, замещенный или незамещенный гетероцикл, замещенный или незамещенный гетероциклилалкил, замещенный или незамещенный аралкил, или замещенный или незамещенный циклоалкилалкил, и

$R^3$  представляет собой H, или замещенный или незамещенный  $C_{1-8}$  алкил.

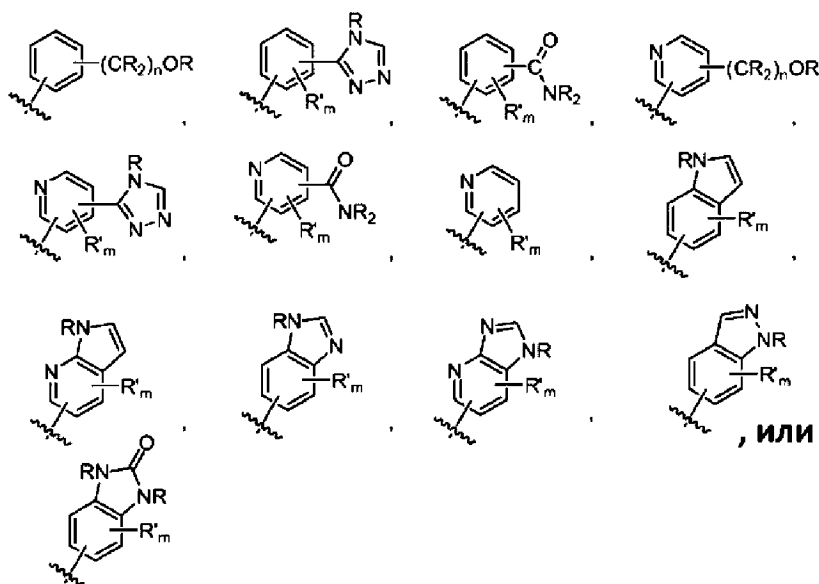
42. Способ по варианту осуществления 41, при этом  $R^1$  представляет собой замещенный или незамещенный арил, или замещенный или незамещенный гетероарил.

43. Способ по варианту осуществления 41 или 42, при этом  $R^1$  представляет собой пиридил, который является замещенным.

44. Способ по любому из вариантов осуществления 41-43, при этом  $R^1$  представляет собой пиридил, замещенный одним или более заместителями, независимо выбранными из группы, состоящей из замещенного или незамещенного  $C_{1-8}$  алкила, замещенного или незамещенного гетероциклила, галогена, аминокарбонила, циано, гидроксилалкила, -OR и -NR<sub>2</sub>, где каждый R независимо представляет собой H, или замещенный или незамещенный  $C_{1-4}$  алкил. В некоторых вариантах осуществления  $R^1$  представляет собой 1H-пирроло[2,3-b]пиридил или бензимидазолил, необязательно замещенный одним или более заместителями, независимо выбранными из группы, состоящей из замещенного или незамещенного  $C_{1-8}$  алкила и -NR<sub>2</sub>, где R независимо представляет собой H, или замещенный или незамещенный  $C_{1-4}$  алкил.

45. Способ по любому из вариантов осуществления 41-44, при этом  $R^1$  представляет собой

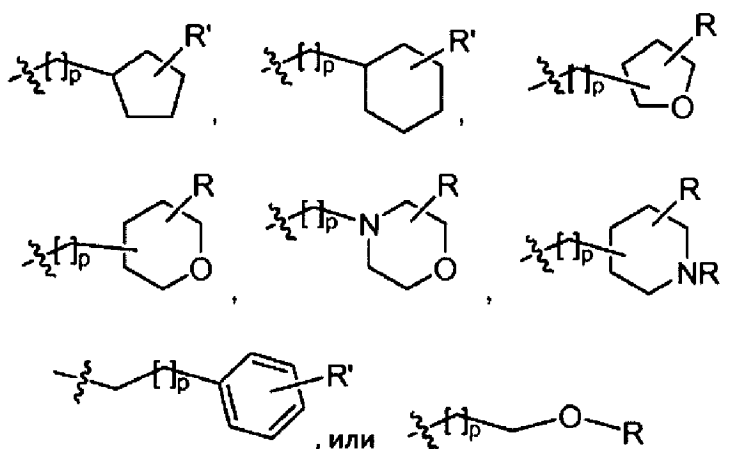




где R в каждом случае независимо представляет собой H, или замещенный или незамещенный C<sub>1-4</sub> алкил (например, метил); R<sup>1</sup> в каждом случае независимо представляет собой замещенный или незамещенный C<sub>1-4</sub> алкил, галоген, циано, -OR или -NR<sub>2</sub>; m равно 0-3 и n равно 0-3.

46. Способ по любому из вариантов осуществления 41-45, при этом R<sup>2</sup> представляет собой H, метил, этил, н-пропил, изопропил, н-бутил, втор-бутил, изобутил, трет-бутил, н-пентил, изопентил, циклопентил, циклогексил, тетрагидрофуранил, тетрагидропиранил, (C<sub>1-4</sub> алкил)фенил, (C<sub>1-4</sub> алкил)циклопропил, (C<sub>1-4</sub> алкил)циклобутил, (C<sub>1-4</sub> алкил)циклопентил, (C<sub>1-4</sub> алкил)циклогексил, (C<sub>1-4</sub> алкил)пирролидил, (C<sub>1-4</sub> алкил)пиперидил, (C<sub>1-4</sub> алкил)пиперазинил, (C<sub>1-4</sub> алкил)морфолинил, (C<sub>1-4</sub> алкил)тетрагидрофуранил или (C<sub>1-4</sub> алкил)тетрагидропиранил, каждый, необязательно, замещенный.

47. Способ по любому из вариантов осуществления 41-46, при этом R<sup>2</sup> представляет собой H, C<sub>1-4</sub> алкил, (C<sub>1-4</sub> алкил)(OR),



где R в каждом случае независимо представляет собой H, или замещенный или незамещенный C<sub>1-8</sub> алкил, R' в каждом случае независимо представляет собой H, -OR,

циано, или замещенный или незамещенный C<sub>1-8</sub> алкил и p равно 0-3.

48. Способ по любому из вариантов осуществления 1-19, 23, 24 или 41-47, при этом средство, ингибирующее активность mTOR, представляет собой соединение 246.

49. Способ получения композиции генетически модифицированных клеток, включающий культивирование в присутствии средства, ингибирующего активность mTOR, композиции генетически модифицированных клеток, содержащей обогащенные первичные человеческие Т-клетки, включающие Т-клетки, генетически модифицированные рекомбинантным рецептором;

при этом средство, ингибирующее активность mTOR, представляет собой соединение 63, соединение 155 или соединение 246; и

при этом способ приводит к пролиферации или размножению клеток в композиции, с получением произведенной композиции, содержащей генетически модифицированные Т-клетки.

50. Способ по варианту осуществления 33 или 49, при этом композицию генетически модифицированных клеток культивируют в присутствии соединения 63 в концентрации от 500 нМ до 2 мкМ, от 1 нМ до 100 нМ, от 50 нМ до 250 нМ или от 100 нМ до 500 нМ.

51. Способ по варианту осуществления 40 или 49, при этом композицию генетически модифицированных клеток культивируют в присутствии соединения 155 в концентрации от 500 нМ до 2 мкМ, от 1 нМ до 100 нМ, от 50 нМ до 250 нМ или от 100 нМ до 500 нМ.

52. Способ по варианту осуществления 48 или 49, при этом композицию генетически модифицированных клеток культивируют в присутствии соединения 246 в концентрации от 500 нМ до 2 мкМ, от 1 нМ до 100 нМ, от 50 нМ до 250 нМ или от 100 нМ до 500 нМ.

53. Способ по варианту осуществления 49, при этом до культивирования способ дополнительно включает:

(а) инкубирование в стимулирующих условиях исходной композиции, содержащей первичные Т-клетки, в присутствии средства, ингибирующего активность mTOR; при этом указанные стимулирующие условия включают присутствие 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, с получением стимулированной композиции; и при этом средство, ингибирующее активность mTOR, представляет собой соединение 63, соединение 155 или соединение 246; и

(b) введение рекомбинантного рецептора в стимулированную композицию, с получением генетически модифицированной композиции, содержащей генетически модифицированные Т-клетки.

54. Способ получения композиции генетически модифицированных клеток,

включающий:

(а) инкубирование в стимулирующих условиях исходной композиции, содержащей первичные человеческие Т-клетки, при этом 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) средства, ингибирующего активность mTOR, при этом средство, ингибирующее активность mTOR, представляет собой соединение 63, соединение 155 или соединение 246; и

(b) введение рекомбинантного рецептора в стимулированную композицию, с получением генетически модифицированной композиции, содержащей генетически модифицированные Т-клетки.

55. Способ по варианту осуществления 53 или варианту осуществления 54, при этом первичные Т-клетки представляют собой обогащенные CD4<sup>+</sup> Т-клетки и/или CD8<sup>+</sup> Т-клетки.

56. Способ по любому из вариантов осуществления 11-48, 53, 54 или 55, при этом стимулирующий реагент включает:

первичное средство, которое специфически связывает компонент комплекса TCR, необязательно, которое специфически связывает CD3; и

необязательно, вторичное средство, которое специфически связывает Т-клеточную костимулирующую молекулу, необязательно, при этом костимулирующую молекулу выбирают из CD28, CD137 (4-1-BB), OX40 или ICOS.

57. Способ по варианту осуществления 55 или варианту осуществления 56, при этом первичное и/или вторичное средства включают антитело, необязательно, при этом использование стимулирующего реагента включает инкубацию с анти-CD3 антителом и анти-CD28 антителом, или их антигенсвязывающими фрагментами.

58. Способ по любому из вариантов осуществления 55-57, при этом первичное средство и/или вторичное средство находятся на поверхности твердой подложки.

59. Способ по варианту осуществления 58, при этом твердая подложка представляет собой или включает гранулу.

60. Способ по варианту осуществления 59, при этом гранула имеет диаметр более или более примерно 3,5 мкм, но не более примерно 9 мкм, или не более примерно 8 мкм, или не более примерно 7 мкм, или не более примерно 6 мкм, или не более примерно 5 мкм.

61. Способ по варианту осуществления 60 или варианту осуществления 61, при этом гранула имеет диаметр, составляющий или составляющий примерно 4,5 мкм.

62. Способ по любому из вариантов осуществления 59-61, при этом гранула является инертной.

63. Способ по любому из вариантов осуществления 59-62, при этом гранула представляет собой или имеет полистирольную поверхность.

64. Способ по любому из вариантов осуществления 59-63, при этом гранула является магнитной или суперпарамагнитной.

65. Способ по любому из вариантов осуществления 59-64, при этом соотношение гранул и клеток составляет от или от примерно 4:1 до 0,25:1.

66. Способ по любому из вариантов осуществления 11-48 или 53-65, при этом введение включает трансдукцию клеток стимулированной композиции вирусным вектором, содержащим полинуклеотид, кодирующий рекомбинантный рецептор.

67. Способ по варианту осуществления 66, при этом вирусный вектор представляет собой ретровирусный вектор.

68. Способ по варианту осуществления 66 или варианту осуществления 67, при этом вирусный вектор представляет собой лентивирусный вектор или гамма-ретровирусный вектор.

69. Способ по любому из вариантов осуществления 11-48 или 53-65, при этом введение включает трансфекцию клеток стимулированной композиции вектором, содержащим полинуклеотид, кодирующий рекомбинантный рецептор.

70. Способ по варианту осуществления 69, при этом вектор представляет собой транспозон, необязательно, транспозон «спящая красавица» (SB) или транспозон Piggybac.

71. Способ по любому из вариантов осуществления 1-14, 16-53 или 55-70, при этом после культивирования способ дополнительно включает сбор клеток произведенной композиции.

72. Способ по любому из вариантов осуществления 1-14, 16-53 или 55-71, дополнительно включающий формулирование клеток произведенной композиции для криоконсервации и/или введения субъекту, необязательно, в присутствии фармацевтически приемлемого эксципиента.

73. Способ по варианту осуществления 72, при этом клетки произведенной композиции формулируют в присутствии криопротектора.

74. Способ по варианту осуществления 73, при этом криопротектор включает ДМСО.

75. Способ по любому из вариантов осуществления 72-74, при этом клетки произведенной композиции формулируют в контейнере, необязательно, флаконе или мешке.

76. Способ по любому из вариантов осуществления 11-48 или 53-75, дополнительно включающий выделение CD4<sup>+</sup> и/или CD8<sup>+</sup> Т-клеток из биологического образца перед инкубацией.

77. Способ по варианту осуществления 76, при этом выделение включает селекцию клеток на основе поверхностной экспрессии CD4 и/или CD8, необязательно, методом положительной или отрицательной селекции.

78. Способ по варианту осуществления 76 или варианту осуществления 77, при этом выделение включает проведение основанной на иммунной аффинности селекции.

79. Способ по любому из вариантов осуществления 76-78, при этом биологический образец содержит первичные Т-клетки, полученные от субъекта.

80. Способ по любому из вариантов осуществления 76-79, при этом биологический образец представляет собой или включает образец цельной крови, образец лейкоцитарной пленки, образец мононуклеарных клеток периферической крови (МКПК), образец не фракционированных Т-клеток, образец лимфоцитов, образец белых клеток крови, продукт афереза или продукт лейкафереза.

81. Способ по любому из вариантов осуществления 1-80, при этом рекомбинантный рецептор способен связывать антиген-мишень, который связан с, специфичен для, и/или экспрессируется на клетке или ткани, связанной с заболеванием, нарушением или состоянием.

82. Способ по варианту осуществления 81, при этом заболевание, нарушение или состояние представляет собой инфекционное заболевание или нарушение, аутоиммунное заболевание, воспалительное заболевание, либо опухоль или рак.

83. Способ по варианту осуществления 81 или 82, при этом антиген-мишень представляет собой опухолевый антиген.

84. Способ по любому из вариантов осуществления 81-83, при этом антиген-мишень выбирают из 5T4, 8H9, интегрина  $\alpha\beta6$ , B7-H6, антигена созревания В-клеток (BCMA), CA9, раково-тестикулярного антигена, карбоангидразы 9 (CAIX), CCL-1, CD19, CD20, CD22, CEA, поверхностного антигена вируса гепатита В, CD23, CD24, CD30, CD33, CD38, CD44, CD44v6, CD44v7/8, CD123, CD138, CD171, карциноэмбрионального антигена (CEA), CE7, циклина, циклина A2, с-Met, двойного антигена, EGFR, эпителиального гликопротеина 2 (EPG-2), эпителиального гликопротеина 40 (EPG-40), ERHa2, эфрина B2, erb-B2, erb-B3, erb-B4, димеров erbB, EGFR vIII, рецептора эстрогена, эмбрионального AchR, фолатного рецептора альфа, фолат-связывающего белка (FBP), FCRL5, FCRH5, эмбрионального ацетилхолинового рецептора, G250/CAIX, GD2, GD3, связанного с G-белками рецептора 5D (GPRC5D), gp100, Her2/neu (рецептора тирозинкиназы erbB2), HMW-MAA, IL-22R-альфа, IL-13 рецептора альфа 2 (IL-13Ra2), рецептора домена киназной вставки (kdr), легкой цепи каппа, Lewis Y, L1-молекулы клеточной адгезии (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), онкоэмбрионального антигена, предпочтительно экспрессируемого антигена меланомы (PRAME), PSCA, рецептора прогестерона, сурвивина, ROR1, TAG72, tEGFR, рецепторов VEGF, VEGF-R2, антигена опухоли Вильямса 1 (WT-1), специфического для патогена антигена и антигена, связанного с универсальным маркером.

85. Способ по любому из вариантов осуществления 1-84, при этом рекомбинантный рецептор представляет собой или включает функциональный не-TCR антигенный рецептор или TCR, или их антигенсвязывающие фрагменты.

86. Способ по любому из вариантов осуществления 1-85, при этом

рекомбинантный рецептор представляет собой химерный антигенный рецептор (CAR).

87. Способ по любому из вариантов осуществления 1-86, при этом рекомбинантный рецептор представляет собой анти-CD19 CAR.

88. Способ по варианту осуществления 87, при этом химерный антигенный рецептор содержит внеклеточный домен, содержащий антигенсвязывающий домен.

89. Способ по варианту осуществления 88, при этом антигенсвязывающий домен представляет собой или включает антитело или фрагмент антитела, который, необязательно, представляет собой одноцепочечный фрагмент.

90. Способ по варианту осуществления 89, при этом фрагмент содержит переменные области антитела, соединенные гибким линкером.

91. Способ по варианту осуществления 89 или варианту осуществления 90, при этом фрагмент представляет собой scFv.

92. Способ по любому из вариантов осуществления 90-91, при этом химерный антигенный рецептор дополнительно содержит спейсер и/или шарнирную область.

93. Способ по любому из вариантов осуществления 90-92, при этом химерный антигенный рецептор содержит внутриклеточную сигнальную область.

94. Способ по варианту осуществления 93, при этом внутриклеточная сигнальная область содержит внутриклеточный сигнальный домен.

95. Способ по варианту осуществления 94, при этом внутриклеточный сигнальный домен представляет собой или включает основной сигнальный домен, сигнальный домен, способный индуцировать основной сигнал активации в Т-клетке, сигнальный домен компонента Т-клеточного рецептора (TCR) и/или сигнальный домен, содержащий иммунорецепторный тирозиновый активирующий мотив (ITAM).

96. Способ по варианту осуществления 95, при этом внутриклеточный сигнальный домен представляет собой или включает внутриклеточный сигнальный домен цепи CD3, необязательно, дзета-цепи CD3 (CD3 $\zeta$ ), или его сигнальный фрагмент.

97. Способ по любому из вариантов осуществления 94-96, при этом химерный антигенный рецептор дополнительно содержит трансмембранный домен, расположенный между внеклеточным доменом и внутриклеточной сигнальной областью.

98. Способ по любому из вариантов осуществления 94-97, при этом внутриклеточная сигнальная область дополнительно содержит костимулирующую сигнальную область.

99. Способ по варианту осуществления 98, при этом костимулирующая сигнальная область содержит внутриклеточный сигнальный домен Т-клеточной костимулирующей молекулы, или его сигнальный фрагмент.

100. Способ по варианту осуществления 98 или варианту осуществления 99, при этом костимулирующая сигнальная область содержит внутриклеточный сигнальный домен CD28, 4-1BB или ICOS, или его сигнальный фрагмент.

101. Способ по любому из вариантов осуществления 99-100, при этом костимулирующая сигнальная область находится между трансмембранным доменом и

внутриклеточной сигнальной областью.

102. Способ по любому из вариантов осуществления 1-14, 16-53 или 55-100, при этом

(i) первичные Т-клетки включают отдельные композиции обогащенных CD4<sup>+</sup> Т-клеток и обогащенных CD8<sup>+</sup> Т-клеток, и при этом композиции обогащенных CD4<sup>+</sup> Т-клеток и обогащенных CD8<sup>+</sup> Т-клеток культивируют отдельно; или

(ii) первичные Т-клетки включают отдельные композиции обогащенных CD4<sup>+</sup> Т-клеток и обогащенных CD8<sup>+</sup> Т-клеток, и при этом композиции смешивают и культивируют обогащенные CD4<sup>+</sup> Т-клетки и обогащенные CD8<sup>+</sup> Т-клетки совместно.

103. Композиция, содержащая генетически модифицированные клетки, полученные способом по любому из вариантов осуществления 1-102.

104. Композиция по варианту осуществления 103, дополнительно содержащая фармацевтически приемлемый носитель.

105. Композиция по варианту осуществления 103 или варианту осуществления 104, содержащая криопротектор, необязательно, ДМСО.

106. Изделие, включающее композицию по любому из вариантов осуществления 103-105, и инструкции по введению произведенной композиции субъекту.

107. Изделие по варианту осуществления 106, при этом субъект имеет заболевание или состояние, необязательно, при этом рекомбинантный рецептор специфически узнает или специфически связывает антиген, связанный с, или экспрессируемый, или присутствующий на клетках, связанных с заболеванием или состоянием.

108. Изделие по варианту осуществления 106 или 107, при этом произведенная композиция представляет собой композицию генетически модифицированных CD4<sup>+</sup> Т-клеток.

109. Изделие по варианту осуществления 107 или 108, при этом произведенная композиция представляет собой композицию генетически модифицированных CD8<sup>+</sup> Т-клеток.

110. Изделие, включающее композицию генетически модифицированных CD4<sup>+</sup> Т-клеток, полученных способом по любому из вариантов осуществления 2-3, 5-6, 9-14, 16-17, 19-49, 51-53 или 56-109, композицию генетически модифицированных CD8<sup>+</sup> Т-клеток, полученных способом по любому из вариантов осуществления 2, 4, 5, 7, 9-13, 15, 16, 18-49, 51-53 или 56-109, и инструкции по введению генетически модифицированных CD4<sup>+</sup> Т-клеток и генетически модифицированных CD8<sup>+</sup> Т-клеток субъекту.

111. Изделие по варианту осуществления 110, при этом инструкции предписывают раздельное введение CD4<sup>+</sup> Т-клеток и CD8<sup>+</sup> Т-клеток субъекту.

112. Изделие по варианту осуществления 110 или 111, при этом инструкции предписывают введение CD4<sup>+</sup> Т-клеток и CD8<sup>+</sup> Т-клеток субъекту в нужном соотношении.

## **IX. Примеры**

[1] Следующие примеры приведены исключительно в иллюстративных целях и не

должны ограничивать объем настоящего изобретения.

**Пример 1: Определение дозы ингибитора киназы mTOR для культур первичных человеческих Т-клеток**

[0564] Эффект дозы иллюстративных ингибиторов киназы mTOR в первичных человеческих Т-клетках оценивали путем мониторинга ингибирования рибосомного белка S6.

[0565] CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-клетки выделяли основанным на иммунной аффинности методом обогащения из лейкофerezных образцов от людей-доноров. Выделенные CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-клетки смешивали 1:1 и стимулировали анти-CD3/анти-CD28 магнитными гранулами в присутствии ингибитора киназы mTOR, PI103, соединения 155, соединения 63 или соединения 246 в возрастающих концентрациях. Т-клеточные культуры инкубировали в течение ночи (примерно 16 час) при 37°C. После инкубации в присутствии PI103, соединения 155, соединения 63 или соединения 246 Т-клетки оценивали на внутриклеточное фосфорилирование S6 и совместно окрашивали на поверхностную экспрессию CD4 или CD8 методом проточной цитометрии.

[0566] Результаты представлены на ФИГ. 1A-D. Все оцениваемые ингибиторы киназы mTOR ингибировали фосфорилирование S6 как в CD4<sup>+</sup>, так и в CD8<sup>+</sup>, Т-клетках. Значения IC<sub>50</sub> для ингибирования фосфорилирования S6 в Т-клетках за счет PI103, соединения 155, соединения 63 и соединения 246 составляли примерно 100 нМ, 100 нМ, 500 нМ и 500 нМ, соответственно. Значения IC<sub>50</sub> для CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-клеток приведены в Таблице E1.

<b>Таблица E1: IC<sub>50</sub> для ингибирования фосфорилирования рибо-S6</b>		
<b>Соединение</b>	<b>CD4</b>	<b>CD8</b>
PI103	121 нМ	88,4 нМ
Соединение 155	121 нМ	127 нМ
Соединение 63	468 нМ	503 нМ
Соединение 246	475 нМ	502 нМ

**Пример 2: Оценка размножения Т-клеток после инкубации в присутствии ингибитора киназы mTOR**

[0567] Отдельные композиции CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> клеток выделяли из человеческих лейкофerezных образцов основанным на иммунной аффинности методом обогащения и замораживали. CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> клеточные композиции затем размораживали и активировали, отдельно культивируя клетки в стимулирующих условиях в присутствии анти-CD3/анти-CD28 магнитных гранул и рекомбинантного IL-2, IL-7 и/или IL-15 в течение примерно 20 часов. Затем клетки трансдуцировали вирусным вектором, кодирующим анти-CD19 химерный антигенный рецептор (CAR). После трансдукции CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> клетки отдельно инкубировали в присутствии ингибитора киназы mTOR, соединения 155, соединения 63 или соединения 246 в разных концентрациях. В качестве контролей клетки инкубировали только со средой, носителем ДМСО или с 200 нМ PI103.



Инкубацию проводили при 37°C в течение примерно 8 дней после размораживания с одной сменой среды, в этот момент соединения повторно добавляли в среду для культивирования в той же концентрации.

[0568] Процентное содержание CD8<sup>+</sup> и CD4<sup>+</sup> Т-клеток после завершения процесса, в сравнении с количеством клеток, высеянных для культивирования после трансдукции, показано на ФИГ. 2. Порог отсечения для выбора переносимой дозы был установлен на 70% от средних значений для контролей со средой и ДМСО. Наибольшая переносимая доза соединения 155, соединения 63 и соединения 246, которая приводила к уровням размножения CD8 и CD4 Т-клеток, аналогичным уровням, наблюдаемым в контрольной группе с носителем, составляла 100 нМ, 1 мкМ и 100 нМ, соответственно.

**Пример 3: Функциональная оценка трансдуцированных химерным антигенным рецептором (CAR) Т-клеток (CAR-Т-клеток), размноженных в присутствии ингибитора киназы mTOR**

[0569] Отдельные композиции CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> клеток получали от трех людей-доноров, активировали и трансдуцировали вирусным вектором, кодирующим анти-CD19 CAR, практически как описано в примере 2. После трансдукции CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-клетки, полученные от каждого донора, отдельно инкубировали в течение 8 дней в присутствии ингибитора киназы mTOR для размножения Т-клеток, практически как описано в примере 2, только в присутствии 200 нМ PI103, 1 мкМ соединения 63, или с носителем ДМСО или только со средой в качестве контролей. CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-клетки от каждого донора отдельно собирали, формулировали и замораживали. Замороженные генетически модифицированные CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-клетки размораживали, промывали для удаления соединения, и клетки от одного и того же донора затем объединяли в соотношении 1:1 жизнеспособных CD4<sup>+</sup>/CAR<sup>+</sup> и жизнеспособных CD8<sup>+</sup>/CAR<sup>+</sup> Т-клеток для получения размноженной анти-CD19 CAR-Т-клеточной композиции, содержащей CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-клетки. Оценивали виды функциональной активности произведенных анти-CD19 CAR-Т-клеточных композиций.

***Гликолитический Метаболизм***

[0570] Изменения клеточного гликолитического метаболизма в ответ на стимуляцию Т-клеточного рецептора (TCR) измеряли в CD8<sup>+</sup> CAR-Т-клетках из полученной анти-CD19 CAR-Т-клеточной композиции до объединения с CD4<sup>+</sup> Т-клетками. Гликолитический метаболизм оценивали путем измерения скорости внеклеточного закисления (ECAR) в CD8<sup>+</sup> CAR-Т-клетках в реальном времени с использованием биоанализатора внеклеточного потока (Seahorse Bioanalyzer, Agilent Technologies). Измерения исходных ECAR проводили на культивируемых CD8<sup>+</sup> CAR-Т-клетках из полученной анти-CD19 CAR-Т-клеточной композиции. После третьего измерения ECAR (примерно 20 минут анализа) к культуре добавляли анти-CD3/анти-CD28 магнитные гранулы. Определяли площадь под кривой (AUC) для скоростей ECAR (мрН/мин) от 0 до 76 минут анализа и максимальный коэффициент гликолитического «взрыва» ECAR относительно контролей, содержащих только среду (n=3 донора).

[0571] Как показано на ФИГ. 3А, стимуляция анти-CD3/анти-CD28 гранулами приводила к увеличению ECAR в CD8<sup>+</sup> CAR-T-клетках во всех произведенных анти-CD19 CAR-T-клеточных композициях. На тенденцию к усиленному гликолитическому «взрыву» при стимуляции TCR CD8<sup>+</sup> CAR-T-клеток в анти-CD19 CAR-T-клетках, полученных путем размножения в присутствии соединения 63, относительно контроля только со средой, указывали результаты ECAR AUC (ФИГ. 3В) или коэффициента ECAR (ФИГ. 3С) для каждого из 3 доноров.

#### ***Сигнализация CAR в размноженных CAR-T-клетках***

[0572] Антиген-зависимую сигнализацию CAR-T-клеток в произведенных анти-CD19 CAR-T-клеточных композициях оценивали путем мониторинга активации фосфо-S6. Клетки из произведенных анти-CD19 CAR-T-клеточных композиций, размноженные в присутствии только среды, носителя ДМСО, PI103 или соединения 63, совместно культивировали с облученными клетками K562, трансдуцированными для экспрессии CD19 (клетки-мишени K562-CD19), в соотношении 1:1. Через 20 часов клетки оценивали на внутриклеточное фосфорилирование S6 и совместно окрашивали на поверхностную экспрессию CD4 или CD8 методом проточной цитометрии.

[0573] Как показано на ФИГ. 4А, после стимуляции антиген-экспрессирующими клетками более высокие уровни фосфо-S6 наблюдали в CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-клетках в каждой из произведенных анти-CD19 CAR-T-клеточных композиций в сравнении с клетками, которые не были стимулированы антигеном. Окрашивание на фосфо-S6 было сходным в CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-клетках в композициях, которые были размножены в присутствии PI103 или соединения 63, в сравнении с контрольными композициями, которые были размножены с носителем ДМСО или только со средой. Эти результаты согласуются с тем фактом, что клетки, размноженные в присутствии ингибиторов киназы mTOR, сохраняют нормальную сигнальную активность киназы mTOR после вымывания ингибитора.

#### ***Цитолитическая активность***

[0574] Для оценки цитолитической активности полученные анти-CD19 CAR-T-клеточные композиции совместно культивировали с клетками-мишенями K562-CD19 при соотношении эффекторных клеток и клеток-мишеней, составляющем либо 3:1, либо 1:1. Клетки-мишени метили NucLight Red (NLR) для возможности отслеживания методом флуоресцентной микроскопии. В качестве отрицательного контроля клетки-мишени K562-CD19 культивировали отдельно или совместно с CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-клетками, не экспрессирующими анти-CD19 CAR. Литическую активность оценивали путем измерения потери жизнеспособных клеток-мишеней через 80 часов на основании красного флуоресцентного сигнала (с использованием системы анализа живых клеток INCUCYTE<sup>®</sup>, Essen Bioscience). Уничтожение клеток количественно определяли как величину, обратную площади под кривой зависимости количества жизнеспособных клеток-мишеней с течением времени.

[0575] Как показано на ФИГ. 4В, клетки, которые были размножены в присутствии PI103 или соединения 63, проявляли цитолитическую активность, сходную с активностью

контрольных клеток, которые были размножены с носителем ДМСО или только со средой. Эти результаты указывают на то, что функция уничтожения клеток-мишеней сохранялась в Т-клетках, размноженных в присутствии ингибиторов киназы mTOR.

### *Измерение цитокинов*

[0576] Для измерения количества цитокинов после стимуляции антигеном клетки из произведенных анти-CD19 CAR-T-клеточных композиций совместно культивировали с облученными клетками-мишенями K562-CD19 или родительскими клетками-мишенями K562 при соотношении эффекторов:мишеней, составляющем 1:1. После культивирования в течение ночи (~16 часов) супернатанты клеточных культур собирали, и продуцирование цитокинов TNF-альфа, IFN-гамма и IL-2 измеряли в мультиплексном анализе Luminex. Кратность изменения продуцирования цитокинов, наблюдаемого в супернатантах совместных культур, определяли в произведенных анти-CD19 CAR-T-клеточных композициях, размноженных в присутствии PI103, соединения 63 или носителя ДМСО, в сравнении с клетками, размноженными только в среде.

[0577] Как показано на ФИГ. 5, продуцирование TNF-альфа, IFN-гамма и IL-2 было обнаружено в Т-клетках, совместно культивированных с антиген-экспрессирующими клетками. Клетки из произведенных анти-CD19 CAR-T-клеточных композиций, которые были размножены в присутствии PI103 или соединения 63, отличались повышенным продуцированием цитокинов в сравнении с контрольными клетками, в частности, в случае продуцирования IFN-гамма, которое было повышено в клетках, размноженных или с PI103, или с соединением 63.

[0578] Внутриклеточные цитокины, CD107 $\alpha$ , IFN-гамма (IFN $\gamma$ ), IL-2, IL-17a и TNF-альфа (TNF $\alpha$ ) оценивали в совместно культивируемых Т-клетках, которые разделяли на две группы и затем инкубировали в течение 5 часов с РМА/иономицином и ингибитором аппарата Гольджи, или только с ингибитором аппарата Гольджи. Внутриклеточное накопление цитокинов выражали в виде кратности изменения частоты встречаемости положительных по цитокинам клеток относительно контролей только со средой. CD8 $^+$  Т-клетки (ФИГ. 6А) и CD4 $^+$  Т-клетки (ФИГ. 6В), которые были размножены с PI103 или соединением 63, демонстрировали повышенную частоту встречаемости определенных полифункциональных цитокиновых профилей в сравнении с контрольными клетками (профили с рамками на ФИГ. 6А и 6В). В частности, CD8 $^+$  Т-клетки демонстрировали повышенный полифункциональный профиль CD107 $\alpha$ +IFN $\gamma$ +TNF $\alpha$ + положительных клеток после повторной стимуляции РМА/иономицином и ингибитором аппарата Гольджи, и повышенный полифункциональный профиль CD107 $\alpha$ +IFN $\gamma$ +IL-2+ клеток после инкубации только с ингибитором аппарата Гольджи (ФИГ. 6А). В CD4 $^+$  клетках повышенный полифункциональный профиль CD107 $\alpha$ +IFN $\gamma$ +TNF $\alpha$ + клеток наблюдали после обработки РМА/иономицином и ингибитором аппарата Гольджи, или только ингибитором аппарата Гольджи, в то время как полифункциональные профили CD107 $\alpha$ +IFN $\gamma$ +IL-2+TNF $\alpha$ + клеток увеличивались после повторной стимуляции РМА/иономицином и ингибитором аппарата Гольджи, и полифункциональные профили

CD107 $\alpha$ +IFN $\gamma$ + клеток увеличивались после инкубации только с ингибитором аппарата Гольджи (ФИГ. 6B).

### *Серийная стимуляция*

[0579] Способность клеток размножаться *ex vivo* после повторных стимуляций в некоторых аспектах может служить показателем способности CAR-T-клеток к персистенции (например, после начальной активации) и/или показателем функционирования *in vivo* (Zhao et al. (2015) Cancer Cell, 28:415-28). Для оценки функционирования клеток в анализе повторной стимуляции полученные анти-CD19 CAR-T-клеточные композиции инкубировали с облученными клетками-мишенями K562-CD19. Каждые 3-4 дня Т-клетки собирали, подсчитывали и повторно стимулировали новыми клетками-мишенями, используя те же условия культивирования, после доведения количеств клеток до исходной плотности высевания в каждом раунде. После четырех раундов повторной стимуляции Т-клетки повторно культивировали еще в течение 4 дней без дополнительной повторной стимуляции клетками-мишенями. Определяли удвоения популяции (ФИГ. 7A) и площадь под кривой (AUC) зависимости удвоений популяции от времени, в сравнении с AUC клеток, размноженных только со средой (ФИГ. 7B).

[0580] Как показано на ФИГ. 7A, количество анти-CD19 CAR-экспрессирующих Т-клеток увеличивалось в данном анализе, что согласуется со способностью данных клеток пролиферировать в присутствии CD19-экспрессирующих клеток. Как видно из кратности изменения AUC для удвоений популяций, Т-клетки из произведенных анти-CD19 CAR-T-клеточных композиций, которые были размножены с соединением 63, имели большее среднее значение AUC в сравнении с Т-клетками, размноженными с P103 или носителем ДМСО (ФИГ. 7B). Это наблюдение свидетельствует о том, что присутствие соединения 63 в процессе размножения CAR-T-клеток способствует устойчивому размножению и выживанию Т-клеток даже после повторной стимуляции антигеном.

[0581] Для оценки активности после дополнительной вторичной стимуляции CAR-T-клетки собирали в день 11 после серийной повторной стимуляции и стимулировали облученными клетками-мишенями K562-CD19 при соотношении эффектор:мишень, составляющем 1:1, в течение примерно 16 часов. Супернатант собирали, и продуцирование цитокинов TNF-альфа, IFN-гамма и IL-2 измеряли с использованием мультиплексного анализа Lumiplex практически как описано выше. Кратность изменения продуцирования цитокинов, наблюдаемого в супернатантах совместных культур из произведенных анти-CD19 CAR-T-клеточных композиций, размноженных в присутствии P103, соединения 63 или носителя ДМСО, сравнивали с показателями клеток, размноженных только в среде; результаты представлены на ФИГ. 7C. Оценка полифункциональных цитокиновых профилей клеток в день 11 после инкубации с ингибитором аппарата Гольджи в течение 4 часов практически как описано выше, продемонстрировала повышенный CD8+ полифункциональный цитокиновый профиль клеток CD107 $\alpha$ +IFN $\gamma$ + (ФИГ. 7D).

[0582] Способность произведенных анти-CD19 CAR-T-клеточных композиций,

которые были размножены в присутствии ингибиторов mTOR, сохранять повышенную способность к продуцированию цитокинов и выживанию при постоянном воздействии антигена согласуется с устойчивостью к функциональному истощению.

### ***CAR-специфическое размножение***

[0583] Способность клеток размножаться после стимуляции CAR оценивали путем инкубации клеток произведенных анти-CD19 CAR-T-клеточных композиций с гранулами, имеющими конъюгированное на поверхности антиидиотипическое антитело, специфическое для анти-CD19 CAR. Конъюгированные с антиидиотипическим антителом гранулы инкубировали с клетками при соотношении гранул и клеток, составляющем 1:1, в лунках 24-луночных емкостей для размножения клеток G-rex (Argos Technologies) в течение 15 дней. Общее количество живых T-клеток на лунку определяли путем подсчета клеток в культурах каждые 5 дней (ФИГ. 8А). Среднюю площадь под кривой (AUC) зависимости количества T-клеток от времени рассчитывали относительно AUC клеток, размноженных только со средой (ФИГ. 8В).

[0584] Как показано на ФИГ. 8А, стимуляция клеток конъюгированными с антиидиотипическим антителом гранулами приводила к начальному размножению, за которым следовало уменьшение количества клеток. T-клетки из произведенных анти-CD19 CAR-T-клеточных композиций, которые ранее были размножены с соединением 63 или P1103, имели более высокое среднее значение AUC в сравнении с T-клетками, ранее размноженными с носителем ДМСО (ФИГ. 8В). Результаты свидетельствуют о том, что присутствие ингибитора киназы mTOR в процессе размножения поддерживает усиленное размножение и выживание после одной CAR-специфической стимуляции.

[0585] Вторичный цитокиновый ответ после стимуляции антиген-экспрессирующими клетками оценивали для CAR-T-клеток, собранных в день 11 после размножения с гранулами, конъюгированными с антиидиотипическим антителом. Стимулированные антиидиотипическим антителом клетки инкубировали с облученными клетками-мишенями K562-CD19 при соотношении эффектор:мишень, составляющем 1:1, в течение примерно 16 часов. Супернатант собирали, и продуцирование цитокинов TNF-альфа, IFN-гамма и IL-2 измеряли с использованием мультиплексного анализа Luminesx практически как описано выше. Кратность изменения продуцирования цитокинов, наблюдаемого в супернатантах совместных культур, определяли для произведенных анти-CD19 CAR-T-клеточных композиций, размноженных в присутствии P1103, соединения 63 или носителя ДМСО, в сравнении с клетками, размноженными только в среде. Как показано на ФИГ. 8С, T-клетки из произведенных анти-CD19 CAR-T-клеточных композиций, которые ранее были размножены с соединением 63 или P1103, демонстрировали повышенное вторичное продуцирование цитокинов после последующей стимуляции антигеном. Кроме того, некоторые полученные от доноров клетки, генетически модифицированные и размноженные с соединением 63, демонстрировали повышенную частоту встречаемости CD8<sup>+</sup> T-клеток, представляющих собой CD107α<sup>+</sup>IFNγ<sup>+</sup> клетки, в день 11, что определили путем внутриклеточного окрашивания

цитокинов после инкубации с ингибитором аппарата Гольджи в течение 4 часов практически как описано выше (ФИГ. 8D).

**Пример 4: Анализ экспрессии генов в генетически модифицированных CD4+ и CD8+ Т-клетках, размноженных в присутствии ингибитора киназы mTOR**

[0586] Экспрессию генов в клетках произведенных анти-CD19 CAR-Т-клеточных композиций, описанных в примере 2, полученных путем размножения клеток в присутствии P1103, соединения 63, носителя ДМСО или только среды, оценивали методом секвенирования РНК (РНК-сек). РНК экстрагировали из клеток композиций, полученных от трех доноров в каждом из условий размножения, и проводили оценку полного транскриптома методом РНК-сек. Определяли значения FPKM и FPKQ; проводили log-преобразование значений FPKQ ( $\log_2$ ). Экспрессию генов определяли путем сравнения профилей экспрессии CD4+, CD8+ или объединенных CD4+/CD8+ клеток произведенных анти-CD19 CAR-Т-клеточных композиций, которые были размножены в присутствии только среды, P1103 или соединения 63, в сравнении с клетками, размноженными с носителем ДМСО. Были идентифицированы генные продукты, отличающиеся в разных группах, путем построения вулканной диаграммы с наложением порога отсечения ЛПР  $\leq 10\%$  между двумя условиями.

[0587] Как показано на вулканной диаграммах на ФИГ. 9А, значительные изменения экспрессии генов были обнаружены в случае CD4+ и/или CD8+ Т-клеток, размноженных в присутствии P1103 или соединения 63, при этом гены с пониженной экспрессией показаны слева от средней точки («0») каждого графика, и гены с повышенной экспрессией показаны справа от средней точки.

[0588] Строили графики экспрессии каждого дифференциально экспрессированного гена в клетках, размноженных с P1103 или соединением 63, в виде  $\text{Log}^2$  кратности изменения в сравнении с экспрессией в клетках, размноженных с ДМСО. Как показано на ФИГ. 9В, имела место линейная зависимость между экспрессией дифференциально экспрессированных генов в клетках, размноженных с P1103 или соединением 63, что указывало на сильную положительную корреляцию между экспрессией дифференциально экспрессируемых генов в клетках, размноженных с P1103, и клетках, размноженных с соединением 63 ( $R^2=0,9$ ).

[0589] Проводили онтологический анализ обогащения для дифференциально экспрессированных генов для идентификации категорий геной онтологии (ГО) на основе регуляторов транскрипции дифференциально экспрессированных генов, которые были активированы или ингибированы в сравнении с экспрессией в клетках, размноженных с носителем ДМСО. TZ-показатели регуляторов транскрипции рассчитывали на основании соответствия ожидаемых направлений транскрипционного эффекта в каждой регуляторной сети и наблюдаемых транскрипционных эффектов в клетках, размноженных с P1103 или соединением 63. На ФИГ. 9С приведены иллюстративные идентифицированные категории ГО, определенные по регуляторному представителю каждого кластера, относительно их соответствующих Z-показателей.

**Пример 5: Оценка опухолевой нагрузки и выживания в модели ксенотрансплантатов после введения CAR-T-клеток, размноженных в присутствии ингибитора киназы mTOR**

[0590] Оценивали противоопухолевые эффекты произведенных анти-CD19 CAR-T-клеточных композиций, полученных путем размножения в присутствии PI103, соединения 63 или только среды, как описано в примере 2. Создавали мышиную модель ксенотрансплантата опухоли путем имплантации *pod scid gamma* (NSG) мышам с иммунодефицитом  $0,5 \times 10^6$  клеток Raji (опухолевая клеточная линия иммортализованных человеческих В-лимфоцитов, экспрессирующих CD19), которые оставляли для приживания. Клетки Raji были трансфицированы геном люциферазы светляков для облегчения обнаружения методом биолюминесцентной визуализации. Через семь дней мышей либо оставляли без лечения, либо вводили им носитель ДМСО, низкую дозу ( $0,25 \times 10^6$ ) или высокую дозу ( $1,0 \times 10^6$ ) CAR+ Т-клеток из произведенных анти-CD19 CAR-T-клеточных композиций. Опухолевую нагрузку оценивали при помощи биолюминесценции каждую неделю или каждые 10 дней.

[0591] Введение несущим опухоль мышам либо низкой, либо высокой, дозы CAR-T-клеток приводило к улучшению показателей опухолевой нагрузки и выживания в сравнении с отсутствием лечения или введением носителя ДМСО. Уменьшение опухолевой нагрузки наблюдали после введения низкой или высокой дозы CAR-T-клеток из анти-CD19 CAR-T-клеточной композиции, которая была размножена в присутствии PI103 (ФИГ. 10А, верхние панели) или соединения 63 (ФИГ. 11А, верхние панели), в сравнении с размножением в присутствии носителя ДМСО. У несущих опухоль мышей, которым вводили низкую или высокую дозу CAR-T-клеток, ранее размноженных в присутствии PI103 или соединения 63, также наблюдали значительно улучшенные показатели выживаемости в сравнении с несущими опухоль мышами, которым вводили CAR-T-клетки, размноженные с носителем ДМСО (ФИГ. 10А и 11А, нижние панели). У несущих опухоль мышей, которым вводили высокую дозу CAR-T-клеток, размноженных в присутствии соединения 63, выживаемость составляла 100% в течение по меньшей мере 80 дней после имплантации клеток опухоли. На ФИГ. 10В и 11В показаны результаты выживаемости несущих опухоль мышей в более поздних временных точках, вплоть до 100 дней после имплантации клеток опухоли, после введения CAR-T-клеток, размноженных в присутствии PI103 или соединения 63, соответственно; результаты согласуются с эффектом клеток, полученных в присутствии соединения 63, заключающимся в повышенной эффективности введенных CAR-T-клеток. Результаты свидетельствуют о том, что CAR-T-клеточная композиция, полученная в присутствии ингибитора киназы mTOR, такого как соединение 63, проявляет повышенную эффективность в *in vivo* анализах. Улучшенные показатели элиминации опухоли и выживаемости в *in vivo* модели согласуются с качественным улучшением состояния и/или функции CAR-T-клеток, которое достигается за счет ингибирования сигнализации mTOR в процессе получения CAR-T-клеток.

**Пример 6: In vitro анализ хронической стимуляции CAR+ Т-клеток с использованием конъюгированных с антиидиотипическим антителом гранул**

[0592] Отдельные композиции CD4+ и CD8+ клеток получали от людей-доноров, стимулировали путем активации анти-CD3/анти-CD28 магнитными гранулами и трансдуцировали вирусным вектором, кодирующим анти-CD19 CAR, имеющий scFv из FMC63. После культивирования в условиях для размножения клеток Т-клеточные композиции, содержащие генетически модифицированные CD4+ и CD8+ Т-клетки, от каждого донора затем отдельно собирали, формулировали и замораживали. Замороженные генетически модифицированные CD4+ и CD8+ Т-клетки размораживали и формулировали при соотношении CD4+ и CD8+ Т-клеток от одного и того же донора, составляющем 1:1, для получения Т-клеточной композиции, содержащей CAR+ Т-клетки. Гранулы, конъюгированные с антиидиотипическим (ID) антителом против анти-CD19 CAR, инкубировали с клетками при соотношении гранул и клеток, составляющем 1:1, в течение 14 дней.

[0593] Вторичный ответ CAR-Т-клеток, собранных в день 14 после CAR-специфической стимуляции конъюгированными с анти-ID гранулами (день 14; вторичный) оценивали после стимуляции антиген-экспрессирующими клетками-мишенями K562-CD19 при соотношении эффекторов и мишеней, составляющем 1:1 (для оценки уровней цитокинов) или 3:1 (для оценки цитолитической активности). Первичный ответ Т-клеток из Т-клеточной композиции, которая не была инкубирована с гранулами, конъюгированными с анти-ID, также определяли путем аналогичной стимуляции антиген-экспрессирующими клетками (день 0; «первичный»). Для оценки цитолитической активности клетки-мишени метили NucLight Red (NLR) для возможности отслеживания методом флуоресцентной микроскопии. Литическую активность оценивали путем измерения потери жизнеспособных клеток-мишеней через 72 часа, что определяли на основании потери флуоресцентного сигнала с течением времени методом кинетической флуоресцентной микроскопии (с использованием системы анализа живых клеток INCUCYTE<sup>®</sup>, Essen Bioscience). Коэффициент цитолиза определяли как величину, обратную площади под кривой (AUC) флуоресценции мишеней с течением времени. Внутриклеточные уровни цитокинов IL-2 и TNF-альфа оценивали методом проточной цитометрии в совместно культивируемых Т-клетках после инкубации в присутствии ингибитора аппарата Гольджи.

[0594] Как показано на ФИГ. 12А, уничтожение клеток-мишеней Т-клеточной композицией, содержащей CAR+ Т-клетки, собранные после CAR-специфической стимуляции в течение 14 дней гранулами, конъюгированными с анти-ID антителом, было уменьшено в сравнении с цитолитической активностью CAR+ Т-клеток, которые ранее не были подвергнуты CAR-специфической стимуляции. Внутриклеточные уровни цитокинов IL-2 и TNF-альфа также были снижены в CAR+ Т-клетках, подвергнутых долгосрочной CAR-специфической стимуляции гранулами, конъюгированными с анти-ID антителом (ФИГ. 12В). Эти результаты согласуются с тем фактом, что долгосрочная CAR-



специфическая стимуляция, например, путем инкубации с гранулами, конъюгированными с анти-ID антителом, в течение 14 дней, приводит к хронической стимуляции CAR и утрате постоянной функции.

[0595] Анализ хронической стимуляции, описанный выше, использовали для оценки эффектов P1103 или соединения 63 на улучшение функции CAR+ Т-клеток после долгосрочной стимуляции. Анти-CD19 CAR+ Т-клеточные композиции получали, как описано выше, за исключением присутствия P1103, соединения 63 или контроля с носителем, начиная с инициации стимуляции. Клетки из каждой произведенной CAR-Т-клеточной композиции инкубировали с парамагнитными гранулами, конъюгированными с анти-ID антителом, при соотношении гранул и клеток, составляющем 1:1, в течение 14 дней.

[0596] Первичный ответ CAR-Т-клеточных композиций после размораживания (без стимуляции гранулами, конъюгированными с анти-ID антителом) или вторичный ответ CAR-стимулированных CAR-Т-клеточных композиций (после 14-дневной CAR-специфической стимуляции гранулами, конъюгированными с анти-ID антителом) оценивали после стимуляции антиген-экспрессирующими клетками. CAR-Т-клеточные композиции культивировали при соотношении 1:1 с K562-CD19 антиген-экспрессирующими клетками в присутствии ингибитора аппарата Гольджи и оценивали продуцирование полифункциональных цитокинов методом проточной цитометрии после внутриклеточного окрашивания цитокинов на IL-2, IFN-гамма и TNF-альфа. Полифункциональный балльный показатель определяли на основании совокупных уровней цитокинов, определенных в CD8+ клетках, после нормирования данных путем масштабирования в группах доноров (ФИГ. 13А). Определяли общее количество секретированных цитокинов IL-2, TNF и IFN-гамма в супернатанте совместных клеточных культур после 20 часов инкубации с клетками-мишенями, и среднее значение нормированных балльных показателей для всех трех цитокинов рассчитывали, как показано на ФИГ. 13А. Как показано на ФИГ. 13А, P1103 или соединения 63 приводили к улучшенным первичному или вторичному ответам, основанным на способности CAR-Т-клеточных композиций к продуцированию цитокинов. Улучшение первичного или вторичного цитолитического ответа после совместного культивирования с клетками-мишенями при соотношении эффекторов и мишеней, составляющем 3:1, как описано выше, также наблюдали в случае Т-клеточных композиций, полученных в присутствии P1103 или соединения 63 (ФИГ. 13В и 13С).

[0597] Данные результаты показывают пригодность анализов с хронической стимуляцией для оценки CAR-Т-клеточных композиций, включая разные CAR-Т-клеточные композиции, полученные в разных условиях, или в присутствии P1103 или соединения 63, или других средств, на их способность к долгосрочному выживанию и/или к устойчивому функционированию после хронической CAR-Т-клеточной стимуляции, что может происходить после продолжительного воздействия антигена *in vivo*.

**Пример 7: Функциональная оценка трансдуцированных химерным**

### **антигенным рецептором (CAR) Т-клеток (CAR-Т-клеток), полученных в присутствии ингибитора киназы mTOR**

[0598] Влияние присутствия ингибитора киназы mTOR при получении клеток дополнительно оценивали в процессе генетической модификации Т-клеток, для которой CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-клеточные популяции отдельно обогащали, а затем смешивали и обрабатывали совместно в одной композиции. Этапы обработки включали этапы стимуляции, трансдукции вектором, кодирующим химерный антигенный рецептор, и размножения.

[0599] Отдельные композиции CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> клеток отбирали из МКПК, выделенных из лейкоцитарного образца от одного и того же человека-донора, методом основанной на иммунной аффинности селекции, и отобранные клеточные композиции замораживали. Отдельные композиции CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-клеток затем размораживали и смешивали жизнеспособные CD4<sup>+</sup> Т-клетки и жизнеспособные CD8<sup>+</sup> Т-клетки в соотношении 1:1. В данном исследовании смешанные CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> клеточные популяции инкубировали в присутствии соединения 63, PI103 или без ингибитора (контроль с носителем ДМСО), начиная с инициации стимуляции. Более подробно, смешанную CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-клеточную композицию стимулировали (в присутствии или в отсутствие ингибитора, как указано) в присутствии парамагнитных покрытых полистиролом гранул с присоединенными анти-CD3 и анти-CD28 антителами в течение 18-30 часов, а затем трансдуцировали лентивирусным вектором, кодирующим анти-CD19 CAR. CAR содержал антигенсвязывающий домен scFv, специфический для CD19 (полученный из FMC63), трансмембранную область CD28, костимулирующую сигнальную область 4-1BB и внутриклеточный сигнальный домен из CD3-дзета. Затем клетки размножали в присутствии цитокинов, как правило, в течение примерно 6-7 дней. Начиная со стимуляции, и в течение всего процесса, среда содержала ДМСО (контроль с носителем), 2 мкМ PI103 или 1 мкМ соединение 63. Контроль с носителем содержал ДМСО в объеме, соответствующем объему добавленного в образцы ингибитора mTOR. Размноженные клетки замораживали. Для оценки замороженные CAR-Т-клетки размораживали и промывали с среде для проведения анализа без поддерживающих цитокинов и без ингибитора или носителя.

[0600] Клетки оценивали методом проточной цитометрии на уровни клеточных поверхностных маркеров и уровни проапоптотического маркера, внутриклеточной каспазы 3. Репрезентативные графики результатов проточной цитометрии для клеток от трех доноров представлены на ФИГ. 14. Как показано, CAR-Т-клетки, полученные в присутствии соединения 63, имели сниженные уровни проапоптотического маркера, внутриклеточной каспазы 3.

[0601] Функциональные характеристики полученных CAR-Т-клеток оценивали в анализе серийной стимуляции путем инкубации полученных CAR-Т-клеток с антителом, конъюгированным с гранулами. Анти-CAR антитело представляло собой антиидиотипическое антитело, узнаваемое полученным из FMC63 scFv в CAR.

Размороженные CAR-T-клетки смешивали с CAR-специфическими гранулами, высевали и инкубировали в течение 14 дней. Каждые 3-4 дня T-клетки подсчитывали. Как показано на ФИГ. 15, произведенные CAR-T-клетки, полученные в присутствии P1103 или соединения 63, отличались усиленным размножением после повторной стимуляции.

[0602] Цитолитическую активность произведенных CAR-T-клеток оценивали путем культивирования произведенных CAR-T-клеток либо сразу после размораживания, либо в день 14 повторной стимуляции, описанной выше, с CD19-экспрессирующими клетками-мишенями при соотношении эффекторов и мишеней, составляющем 3:1. Гибель клеток-мишеней количественно определяли с течением времени. Площадь под кривой (AUC) зависимости сигнала от времени для роста опухолевых клеток определяли для каждой концентрации. Коэффициент цитолиза рассчитывали как величину, обратную площади под кривой роста опухолевых клеток (1/AUC). CAR-T-клетки, полученные способом в присутствии P1103 или соединения 63, демонстрировали повышенное уничтожение клеток-мишеней (ФИГ. 16) в сравнении с CAR-T-клетками, полученными в присутствии ДМСО.

[0603] Внутриклеточные уровни цитокинов контролировали в клетках совместных культур, инкубированных с произведенными CAR-T-клетками сразу после размораживания или CAR-T-клетками после вторичной повторной стимуляции CD19-экспрессирующими клетками-мишенями. CAR-T-клетки инкубировали с экспрессирующими мишень клетками в присутствии ингибитора аппарата Гольджи в течение 5 часов. Определяли внутриклеточную экспрессию IL-2, TNF-альфа и IFN-гамма и рассчитывали полифункциональный балльный показатель путем установки дискриминационного окна для совокупных CAR-T-клеток, положительных по IL-2 и любому сочетанию IFN-гамма и TNF-альфа. Как показано на ФИГ. 17А, CAR-T-клетки, полученные в присутствии P1103 или соединения 63, демонстрировали улучшенные полифункциональные профили эффекторных цитокинов в обоих подмножествах CD8+ и CD4+ клеток как после первичной, так и после вторичной, стимуляции (ФИГ. 17А) в сравнении с CAR-T-клетками, полученными в присутствии ДМСО. Произведенные CAR-T-клетки также культивировали с экспрессирующими антиген CD19 клетками в течение 20 часов и оценивали уровни IL-2, TNF-альфа и IFN-гамма в супернатантах клеточных культур методом ELISA. CAR-T-клетки, полученные с P1103 или соединением 63, демонстрировали повышенные уровни секретируемых цитокинов в супернатантах (ФИГ. 17В).

[0604] В совокупности, данные результаты согласуются с тем фактом, что присутствие P1103 и соединения 63 в процессе получения CAR-T-клеток из смешанной популяции CD4+ и CD8+ T-клеток приводит к усилению CAR-T-клеточной функции и активности.

**Пример 8: Анализ экспрессии генов в CAR-T-клетках, полученных в присутствии ингибитора киназы mTOR**

[0605] Экспрессию генов в клетках композиций, содержащих анти-CD19 CAR-T-

клетки (полученные в присутствии ДМСО, PI103 или соединения 63, как описано в примере 7), оценивали в анализе дифференциальной экспрессии (DESeq2) методом РНК-сек. РНК-сек проводили на образцах комплементарной ДНК (кДНК), полученной из РНК, выделенной из CAR-T-клеток. Анализ основных компонентов (PCA) проводили для наборов данных РНК-сек, полученных из DESeq2-нормированных данных. Анализы уровней дифференциальной экспрессии генов проводили в R (версия 3.4) с использованием пакета DESeq2 (версия 1.16.1) путем сравнения образцов, обработанных соединением, с контролем с ДМСО, с контролем для доноров. Перед проведением анализа дифференциальной экспрессии набор генов фильтровали для исключения генов с нулевыми результатами во всех образцах. Дифференциально экспрессируемые (ДЭ) гены идентифицировали путем применения порога отсечения для  $\log_2$  кратности изменения 0,5 и скорректированного по методу Бенджамини-Хохберга порога отсечения для уровня ложноположительных результатов (ЛПР) 0,1. Наблюдали как перекрывающиеся, так и неперекрывающиеся, профили экспрессии генов в композициях, содержащих CAR-T-клетки, полученные в присутствии PI103 или соединения 63 (ФИГ. 18).

**Пример 9: Оценка опухолевой нагрузки и выживания в модели ксенотрансплантатов опухолей после введения CAR-T-клеток, полученных в присутствии ингибитора киназы mTOR**

[0606] Противоопухолевые эффекты анти-CD19 CAR-T-клеточных композиций, полученных в присутствии ДМСО, PI103 или соединения 63, как описано в примере 7, оценивали *in vivo*. Создавали мышиную модель ксенотрансплантата опухоли путем имплантации *pod scid gamma (NSG)* мышам с иммунодефицитом  $0,5 \times 10^6$  клеток Raji (опухолевая клеточная линия иммортализованных человеческих В-лимфоцитов, экспрессирующих CD19), которые оставляли для приживания. Клетки Raji были трансфицированы геном люциферазы светляков для облегчения обнаружения методом биолюминесцентной визуализации. Через семь дней мышей либо оставляли без лечения, либо вводили им низкую дозу ( $0,25 \times 10^6$ ) или высокую дозу ( $1,0 \times 10^6$ ) анти-CD19 CAR+ Т-клеток, полученных в присутствии ДМСО (носителя) или ДМСО и ингибитора киназы mTOR. Опухолевую нагрузку и смертность оценивали еженедельно.

[0607] Анти-CD19 CAR-T-клеточные композиции, полученные отдельно из клеток трех разных людей-доноров способом, включающим присутствие ДМСО, имели наглядные противоопухолевые эффекты на животных в данном исследовании, в сравнении с животными, не получавшими лечение, при этом у получавших лечение животных наблюдалась пониженная смертность. Результаты для клеток, полученных от соответствующего донора, показаны на ФИГ. 19А-В и 20А-20В. Включение ингибитора киназы mTOR соединения 63 (в сравнении с отсутствием ингибитора, то есть, с носителем ДМСО) в процесс получения CAR-T-клеток приводило к улучшению *in vivo* противоопухолевых ответов у животных в данном исследовании. Иллюстративные результаты представлены на ФИГ. 20А и 20В. Практически аналогичные результаты наблюдались для CAR-T-клеток, полученных от другого донора. Результаты сравнения

CAR-T-клеток, полученных в присутствии или в отсутствие ингибитора P103, представлены на ФИГ. 19А и 19В. В случае CAR-T-клеток, полученных от другого донора, сопоставимые противоопухолевые эффекты наблюдали для клеток, полученных в присутствии P103, и для клеток, полученных в отсутствие ингибитора (с носителем ДМСО).

#### **Пример 10: Оценка персистенции CAR-T-клеток in vivo**

[0608] Присутствие и количества анти-CD19 CAR-T-клеток оценивали в крови у животных после введения животным композиций, содержащих клетки, полученные в присутствии P103, соединения 63 или без ингибитора (как описано в примере 7). Использовали модель ксенотрансплантата клеток Raji (CD19+ лимфомы Беркитта), описанную в примере 9. Мыши либо не получали лечение, либо получали низкую дозу ( $0,25 \times 10^6$ ) или высокую дозу ( $1,0 \times 10^6$ ) соответствующих анти-CD19 CAR+ Т-клеточных композиций. Опухолевую нагрузку и смертность оценивали каждые 7-10 дней.

[0609] У мышей собирали кровь в дни 18, 25 и 36 после инфузии, и присутствие циркулирующих CAR+ CD4+ Т-клеток или CAR+ CD8+ Т-клеток в периферической крови оценивали методом проточной цитометрии. Включение либо соединения 63, либо P103, в процессе получения CAR-T-клеток от одного и того же донора, как описано в примере 10, приводило к увеличению количеств CAR+ Т-клеток с течением времени, это соответствовало выводу о том, что использование ингибиторов при получении клеточных композиций приводит к более заметному присутствию, например, вследствие усиленного размножения или персистенции, клеток in vivo после введения в данной животной модели опухоли (ФИГ. 21А и 21В). Практически аналогичные результаты были получены в случае CAR-T-клеток, полученных от второго донора.

[0610] Объем настоящего изобретения не должен быть ограничен конкретными раскрытыми вариантами осуществления, которые предложены, например, для иллюстрации различных аспектов изобретения. Различные модификации описанных композиций и способов станут очевидными из приведенного в настоящем документе описания и изложенных идей. Такие вариации могут быть осуществлены на практике без отклонения от объема и сущности изобретения и должны входить в объем настоящего изобретения.

#### **ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ**

<b>SEQ ID NO.</b>	<b>ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ</b>	<b>ОПИСАНИЕ</b>
<b>1</b>	ESKYGPPCPPCP	спейсер (шарнир IgG4) (ак) Homo sapiens
<b>2</b>	GAATCTAAGTACGGACCGCCCTGCCCCCTTGCC CT	спейсер (шарнир IgG4) (нт) Homo sapiens

3	ESKYGPPCPPCPGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVS LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD SDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHN HYTQKSLSLSLGK	спейсер шарнир- CH3 Homo sapiens
4	ESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMT KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMH EALHNHYTQKSLSLSLGK	спейсер шарнир- CH2-CH3 Homo sapiens
5	RWPEPKAQASSVPTAQPQAEGSLAKATTAPATTR NTGRGGEEKKKEKEKEEQEERETKTPECPSHTQPL GVYLLTPAVQDLWLRDKATFTCFVVGSDLKDAHL TWEVAGKVPTGGVEEGLLERHSNGSQSQRSRLTLP RSLWNAGTSVTCTLNHPSLPPQRLMALREPAQAP VKLSLNLASSDPPEAASWLLCEVSGFSPNILLMW LEDQREVNTSGFAPARPPPQPGSTTFWAWSVLRVP APPSPQPATYTCVVSHEDSRLLNASRSLEVSYVTD H	IgD-шарнир-Fc Homo sapiens
6	LEGGGEGRGSLLTCGDVEENPGPR	T2A, искусственная
7	MLLLVTSLLLCELPHPAFLIPRKVCNGIGIGEFKDS LSINATNIKHFKNCTSIGDLHILPVAFRGDSFTHTPP LDPQELDILKTVKEITGFLLIQAWPENRTDLHAFEN LEIIRGRTKQHGQFSLAVVSLNITSLGLRSLKEISDG DVIISGNKNLCYANTINWKKLFGTSGQKTKIISNRG ENSCKATGQVCHALCSPEGCWGPEPRDCVSCRNVS RGRECVDKCNLLEGEPREFVENSECIQCHPECLPQA MNITCTGRGPDNCIQCAHYIDGPHCVKTCPAGVMG ENNTLVWKYADAGHVCHLCHPNCTYGCTGPGLEG CPTNGPKIPSIATGMV GALLLLL VVALGIGLFM	tEGFR, искусственная
8	FWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWV	CD28 (аминокислоты 153- 179 в последовательности

		с регистрационным № P10747) Homo sapiens
<b>9</b>	IEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPFLPGPS KPFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWV	CD28 (аминокислоты 114-179 в последовательности с регистрационным № P10747) Homo sapiens
<b>10</b>	RSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRD FAAYRS	CD28 (аминокислоты 180-220 в P10747) Homo sapiens
<b>11</b>	RSKRSRGGHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPR DFAAYRS	CD28 (LL на GG) Homo sapiens
<b>12</b>	KRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEE EGGCEL	4-1BB (аминокислоты 214-255 в Q07011.1) Homo sapiens
<b>13</b>	RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDV LDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKM AEAYSEIGMKGERRRGKGDGLYQGLSTATKDTY DALHMQALPPR	CD3-дзета Homo sapiens
<b>14</b>	RVKFSRSAEPPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVL DKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMA EAYSEIGMKGERRRGKGDGLYQGLSTATKDTYD ALHMQALPPR	CD3-дзета Homo sapiens
<b>15</b>	RVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDV LDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKM AEAYSEIGMKGERRRGKGDGLYQGLSTATKDTY DALHMQALPPR	CD3-дзета Homo sapiens
<b>16</b>	RKVCNGIGIGEFKDSLSINATNIKHFKNCTSISGDLH ILPVAFRGDSFTHTPPLDPQELDILKTVKEITGFLLIQ	tEGFR, искусственная

	AWPENRTDLHAFENLEIIRGRTKQHGQFSLAVVSL NITSLGLRSLKEISDGDVIISGNKNLCYANTINWKKL FGTSGQKTKIISNRGENSCKATGQVCHALCSPEGC WGPEPRDCVSCRNVSRGRECVDKCNLLEGEPPREFV ENSECIQCHPECLPQAMNITCTGRGPDNCIQCAHYI DGPHCVKTCPAGVMGENNTLVWKYADAGHVCHL CHPNCTYGCTGPGLEGCP TNGPKIPSIATGMVGALL LLLVVALGIGLFM	
17	EGRGSLTTCGDVEENPGP	T2A, искусственная
18	GSGATNFSLLKQAGDVEENPGP	P2A
19	ATNFSLLKQAGDVEENPGP	P2A
20	QCTNYALLKLAGDVESNPGP	E2A
21	VKQTLNFDLLKLAGDVESNPGP	F2A
22	PGGG-(SGGGG)5-P-, где P представляет собой пролин, G представляет собой глицин и S представляет собой серин	Иллюстративный линкер
23	GSADDAKKDAAKKDGKS	Иллюстративный линкер
24	GSTSGSGKPGSGEGSTKG	Иллюстративный линкер
25	Glu Val Val Val Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro	Иллюстративный шарнир IgG
26	X1PPX2P X1 представляет собой глицин, цистеин или аргинин X2 представляет собой цистеин или треонин	Иллюстративный шарнир IgG
27	Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro	Иллюстративный шарнир IgG
28	Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro	Иллюстративный шарнир IgG
29	ELKTPLGDTHTCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPEPKSCDTPPPCPRCP	Иллюстративный шарнир IgG
30	Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro	Иллюстративный шарнир IgG
31	Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro	Иллюстративный шарнир IgG



		шарнир IgG
32	Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro	Иллюстративный шарнир IgG
33	Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro	Иллюстративный шарнир IgG
34	MLGTGPAAATTAATTSSNVSVLQQFASGLKSRNEE TRAKAAKELQH YVTMELREMSQEESTRFYDQLNH HIFELVSSSDANERKGGILAIASLIGVEGGNATRIGR FANYLRNLLPSNDPVV MEMASKAIGRLAMAGDTF TAEYVEFEVKRALEWLGADRNEGRRHAAV LVLRE LAISVPTFFFQQVQPFFDNIFVAVWDPKQAIREGAV AALRACLILTTQREP KEMQKPQWYRHTFEEAEKGF DETLAKEKGMNRDDRIHGALLILNELVRISSEGE RLREEMEEITQQQLVHDKYCKDLMGFGTKPRHITP FTSFQAVQPQQSNALVGLLGYSSHQGLMGFGTSPS PAKSTLVESRCCRDLMEEKFDQVCQWVLKCRNSK NSLIQMTILNLLPRLAAFRPSAFTDTQYLQDTMNHV LSCVKKEKERTA AFQALGLLSVAVRSEFKVYLPRV LDIIRAALPPKDFAHKRQKAMQVDATVFTCISMLA RAMGPGIQQDIKELLEPMLAVGLSPALTA VLYDLS RQIPQLKKDIQDGLLKMLSLVLMHKPLRHPGMPKG LAHQLASPGLTTLPEASDVGSITLALRTLGSFEFEG HSLTQFVRHCADHFLNSEHKEIRMEAARTCSRLLTP SIHLISGHAHVVSQTAVQVVADVLSKLLVVGITDPD PDIRYCVLASLDERFDAHLAQAENLQALFVALNDQ VFEIRELAICTVGR LSSMNP AFVMPFLRKMLIQILTE LEHSGIGRIKEQSARMLGHLVSNAPRLIRPYMEPIL KALILKLKDPDPDPNPGVINNVLATIGELAQVSGLE MRKWVDELFIIMDMLQDSSLLAKRQVALWTLGQ LVASTGYVVEPYRKYPTLLEVLLNFLKTEQNQGTR REAIRVLGLLGALDPYKHKVNIGMIDQSRDASAVS LSEKSSQDSSDYSTSEMLVNMGNLPLDEFYPAVS MVALMRIFRDQSLSHHHTMVVQAITFIFKSLGLKC VQFLPQVMPTFLNVIRVCDGAIREFLFQQLGMLVSF VKSHIRPYMDEIVTLMREFWVMNTSIQSTIILLIEQI	Белок mTOR человека

VVALGGFEKLYLPQLIPHMLRVFMHDNSPGRIVSIK  
 LLAAIQLFGANLDDYLHLLLPIVKLFDAPPEAPLPSR  
 KAALETVDRLTESLDFTDYASRIIHPIVRTLDQSPEL  
 RSTAMDTLSSLVFQLGKKYQIFIPMVNKVLRHRIN  
 HQRYDVLICRIVKGYTLADEEEDPLIYQHRMLRSG  
 QGDALASGPVETGPMKKLHVSTINLQKAWGAARR  
 VSKDDWLEWLRRLSLELLKDSSSPSLRSCWALAQA  
 YNPMARDLFNAAFVSCWSELNEDQQDELIRSIELA  
 LTSQDIAEVTQTLNLAEFMEHSDKGPLPLRDDNGI  
 VLLGERAAKCRAYAKALHYKELEFQKGPTPAILES  
 LISINNKLQQPEAAAGVLEYAMKHFGELEIQATWY  
 EKLHEWEDALVAYDKKMDTNKDDPELMLGRMRC  
 LEALGEWGQLHQQCCEKWTLVNDDETQAKMARMA  
 AAAAWGLGQWDSMEEYTCMIPRDTHDGAFYRAV  
 LALHQDLFSLAQQCIDKARDLLDAELTAMAGESYS  
 RAYGAMV SCHMLSELEEVIQYKLVPERREIIRQIW  
 WERLQGCQRIVEDWQKILMVRSLVVSPHEDMRTW  
 LKYASLCGKSGRLALAHKTLVLLLGVDP SRQLDHP  
 LPTVHPQVTYAYMKNMWKSARKIDAFQHMQH FV  
 QTMQQAQHAIA TEDQQHKQELHKLMAOIQYV LKL  
 GEWQLNLQGINESTIPKVLQYYSAATEHDRSWYKA  
 WHAWAVMNF EAVLHYKHQNQARDEKKKLRHAS  
 GANITNATTAATTAATATTTASTE GSNSESEAESTE  
 NSPTPSPLQKKVTE DLSKTLLMYTVP AVQGGFRISL  
 SRGNNLQD TLRVLT LWFDYGHWP DVNEALVEGV  
 KAIQIDTWLQVIPQLIARIDTPRPLVGR LIHQLLTDIG  
 RYHPQALIYPLTVASKSTTTARHNAANKILKNMCE  
 HSNTLVQQAMMVSEELIRVAILWHEMWHEGLEEA  
 SRLYFGERNVKG MFVLEPLHAMMERGPQTLKET  
 SFNQAYGRDLMEAEQEWCRKYMKSGNVKDLTQA  
 WDLYYHVFRRISKQLPQLTSLELQYVSPKLLMCRD  
 LELAVPGTYDPNQPIIRIQSIAPSLQVITSKQRPRKLT  
 LMGSNGHEFVFLKGHEDLRQDERVMQLFGLVNT  
 LLANDPTSLRKNLSIQRYAVIPLSTNSGLIGWVPHC  
 DTLHALIRDYREKKKILLNIEHRIMLRMAPDYDHLT

	LMQKVEVFEHAVNNTAGDDLAKLLWLKSPSSEVW FDRRTNYTRSLAVMSMVG YILGLGDRHPSNLMLD RLSGKILHIDFGDCFEVAMTREKFPEKIPFRLTRMLT NAMEVTGLDGNYRITCHTVMEVLREHKDSVMAVL EAFVYDPLLNWRLMDTNTKGNKRSRTRTDSYSAG QSVEILDGVELGEP AHKKTGTTVPESIHSFIGDGLV KPEALNKKAIQIINRVRDKLTGRDFSHDDTLDVPTQ VELLIKQATSHENLCQCYIGWCPFW	
35	QQGNTLPYT	CDR L3
36	RASQDISKYLN	CDR L1
37	SRLHSGV	CDR L2
38	GNTLPYTFG	CDR L3
39	DYGV S	CDR H1
40	VIWGSETTYNSALKS	CDR H2
41	YAMDYWG	CDR H3
42	EVKLQESG PGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGV S WIRQPPRKGLEWLGVIWGSETTYNSALKSRLTIK DNSKSQVFLKMNSLQTDDTAIYYCAKHYYYGGSY AMDYWGQGTSVTVSS	VH
43	DIQMTQT TSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYL N WY QQKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYS LTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGG TKLEIT	VL
44	DIQMTQT TSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYL N WY QQKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYS LTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGG TKLEITGS TSGSGKPGSGEGSTKGEVKLQESG PGLVAPSQSLSV TCTVSGVSLPDYGV SWIRQPPRKGLEWLGVIWGSE TTYNSALKSRLTIKDNSKSQVFLKMNSLQTDDTA IYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGTSVTVSS	scFv
45	KASQNVGTNVA	CDR L1
46	SATYRNS	CDR L2
47	QQYNRYPYT	CDR L3
48	SYWMN	CDR H1
49	QIYPGDGDTNYNGKFKG	CDR H2

<b>50</b>	KTISSVDFYFDY	CDR H3
<b>51</b>	EVKLQQSGAELVRPGSSVKISCKASGYAFSSYWMN WVKQRPGQGLEWIGQIYPGDGDTNYNGKFKGQAT LTADKSSSTAYMQLSGLTSEDSAVYFCARKTISSVV DFYFDYWGQGTTVTVSS	VH
<b>52</b>	DIELTQSPKFMSTSVGDRVSVTCKASQNVGTNVAW YQQKPGQSPKPLIYSATYRNSGVPDRFTGSGSGTDF TLTITNVQSKDLADYFCQQYNRYPYTSGGGTKLEI KR	VL
<b>53</b>	GGGGSGGGGSGGGGS	Линкер
<b>54</b>	EVKLQQSGAELVRPGSSVKISCKASGYAFSSYWMN WVKQRPGQGLEWIGQIYPGDGDTNYNGKFKGQAT LTADKSSSTAYMQLSGLTSEDSAVYFCARKTISSVV DFYFDYWGQGTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDI ELTQSPKFMSTSVGDRVSVTCKASQNVGTNVAWY QQKPGQSPKPLIYSATYRNSGVPDRFTGSGSGTDF LTITNVQSKDLADYFCQQYNRYPYTSGGGTKLEIK R	scFv
<b>55</b>	HYYYGGSYAMDY	CDR H3
<b>56</b>	HTSRLHS	CDR L2
<b>57</b>	GSTSGSGKPGSGEGSTKG	Линкер
<b>58</b>	gacatccagatgaccagaccacctccagcctgagcgcaccgctgggcgacc gggtgaccatcagctgccggccagccaggacatcagcaagtacctgaactgg tatcagcagaagcccagcggcaccgtcaagctgctgatctaccacaccagccg gctgcacagcggcgtgccagccggttagcggcagcggctccggcaccgac tacagcctgaccatctccaacctggaacaggaagatatgccacctactttgcc agcagggcaacacactgccctacacctttggcggcggaaacaagctggaaatc accggcagcacctccggcagcggcaagcctggcagcggcgagggcagcac caagggcgaggtgaagctgcaggaaagcggccctggcctggtggccccag ccagagcctgagcgtgacctgcaccgtgagcggcgtgagcctgcccactac ggcgtgagctggatccggcagccccaggaaggcctggaatggctgggc gtgatctggggcagcagaccacctactacaacagcgcctgaagagccggct gaccatcatcaaggacaacagcaagagccaggtgttctgaagatgaacagcc tcgagaccgacgacaccgcatctactactgcccaagcactactactacggcg	Последовательность , кодирующая scFv

	gcagctacgcatggactactggggccagggcaccagcgtgaccgtgagcag c	
<b>59</b>	MPLLLLLPLLWAGALA	CD33, сигнальный пептид
<b>60</b>	MALPVTALLLPLALLHA	CD8-альфа, сигнальный пептид
<b>61</b>	atgcttctcctggtgacaagccttctgctctgtgagttaccacaccagcattcctc ctgatecca	GMCSFR, сигнальная последовательность альфа-цепи
<b>62</b>	MLLLVTSLLLCELPHPAFLIP	GMCSFR, сигнальная последовательность альфа-цепи

## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ получения композиции генетически модифицированных клеток, включающий:

(а) инкубирование в стимулирующих условиях исходной композиции, содержащей первичные человеческие Т-клетки, при этом 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) средства, ингибирующего активность mTOR, при этом средство, ингибирующее активность mTOR, выбирают из 2-(3-гидроксифенил)-9-(2-изопропилфенил)-8-оксо-8,9-дигидро-7Н-пурин-6-карбоксамида (соединение 63), 6-(4-(2Н-1,2,4-триазол-3-ил)фенил)-1-(2-(тетрагидро-2Н-пиран-4-ил)этил)-1Н-имидазо-[4,5-б]пиразин-2(3Н)-она (соединение 155) или 7-(6-(2-гидроксипропан-2-ил)пиридин-3-ил)-1-((1г,4г)-4-метоксициклогексил)-3,4-дигидропиразино[2,3-б]пиразин-2(1Н)-она (соединение 246); и

(b) введение рекомбинантного рецептора в стимулированную композицию, с получением генетически модифицированной композиции, содержащей генетически модифицированные Т-клетки.

2. Способ по п. 1, включающий дополнительное инкубирование генетически модифицированных клеток в присутствии средства, ингибирующего активность mTOR, с получением произведенной композиции.

3. Способ по п. 2, при этом дополнительное инкубирование проводят в присутствии одного или более рекомбинантных цитокинов.

4. Способ по п. 2 или п. 3, при этом дополнительное инкубирование включает культивирование в условиях, приводящих к пролиферации или размножению клеток в композиции.

5. Способ получения композиции генетически модифицированных клеток, включающий культивирование в присутствии средства, ингибирующего активность mTOR, композиции генетически модифицированных клеток, содержащей обогащенные первичные человеческие Т-клетки, включающие Т-клетки, генетически модифицированные рекомбинантным рецептором;

при этом средство, ингибирующее активность mTOR, выбирают из 2-(3-гидроксифенил)-9-(2-изопропилфенил)-8-оксо-8,9-дигидро-7Н-пурин-6-карбоксамида (соединение 63), 6-(4-(2Н-1,2,4-триазол-3-ил)фенил)-1-(2-(тетрагидро-2Н-пиран-4-ил)этил)-1Н-имидазо-[4,5-б]пиразин-2(3Н)-она (соединение 155) или 7-(6-(2-гидроксипропан-2-ил)пиридин-3-ил)-1-((1г,4г)-4-метоксициклогексил)-3,4-дигидропиразино[2,3-б]пиразин-2(1Н)-она (соединение 246); и

при этом способ приводит к пролиферации или размножению клеток в композиции, с получением произведенной композиции, содержащей генетически модифицированные Т-клетки.

6. Способ по п. 5, при этом до культивирования способ дополнительно включает:

(а) инкубирование в стимулирующих условиях исходной композиции, содержащей первичные Т-клетки, в присутствии средства, ингибирующего активность mTOR; при этом указанные стимулирующие условия включают присутствие 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, с получением стимулированной композиции; и при этом средство, ингибирующее активность mTOR, представляет собой соединение 63, соединение 155 или соединение 246; и

(b) введение рекомбинантного рецептора в стимулированную композицию, с получением генетически модифицированной композиции, содержащей генетически модифицированные Т-клетки.

7. Способ получения композиции генетически модифицированных клеток, включающий культивирование в присутствии средства, ингибирующего активность mTOR, композиции генетически модифицированных клеток, содержащей первичные человеческие Т-клетки, включающие клетки, генетически модифицированные рекомбинантным рецептором, при этом клетки в композиции не подвергались воздействию средства до культивирования; и

при этом способ приводит к пролиферации или размножению клеток в композиции, с получением произведенной композиции, содержащей генетически модифицированные Т-клетки.

8. Способ по любому из пп. 1-7, при этом первичные Т-клетки представляют собой CD4+ и/или CD8+ Т-клетки.

9. Способ по любому из пп. 5-8, при этом композиция генетически модифицированных Т-клеток содержит обогащенные CD4+ Т-клетки.

10. Способ по любому из пп. 5-8, при этом композиция генетически модифицированных Т-клеток содержит обогащенные CD8+ Т-клетки.

11. Способ получения композиции генетически модифицированных клеток, включающий культивирование в присутствии средства, ингибирующего активность mTOR, композиции генетически модифицированных клеток, содержащей обогащенные CD4+ или обогащенные CD8+ первичные человеческие Т-клетки, включающие Т-клетки, генетически модифицированные рекомбинантным рецептором;

при этом способ приводит к пролиферации или размножению клеток в композиции, с получением произведенной композиции, содержащей генетически модифицированные обогащенные CD4+ или обогащенные CD8+ Т-клетки.

12. Способ по любому из пп. 5-9 и 11, при этом композиция генетически модифицированных Т-клеток содержит более или более примерно 70%, более или более примерно 75%, более или более примерно 80%, более или более примерно 85%, более или более примерно 90%, более или более примерно 95%, или более или более примерно 98%

CD4+ первичных человеческих Т-клеток; и/или

исходная композиция состоит в основном из CD4+ первичных человеческих Т-клеток.

13. Способ по любому из пп. 5-8 и 10, при этом композиция генетически модифицированных Т-клеток содержит более или более примерно 70%, более или более примерно 75%, более или более примерно 80%, более или более примерно 85%, более или более примерно 90%, более или более примерно 95%, или более или более примерно 98% CD8+ первичных человеческих Т-клеток; и/или

исходная композиция состоит в основном из CD8+ первичных человеческих Т-клеток.

14. Способ по любому из пп. 5-12, при этом культивирование проводят в присутствии одного или более рекомбинантных цитокинов.

15. Способ по п. 3, 4 или 8, при этом один или более рекомбинантных цитокинов включают один или более из IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-12, IL-15, G-CSF и GM-CSF, необязательно, при этом один или более рекомбинантных цитокинов включают один или более из IL-2, IL-7 или IL-15.

16. Способ по любому из пп. 5-15, при этом до культивирования способ дополнительно включает:

(а) инкубирование в стимулирующих условиях исходной композиции, содержащей первичные Т-клетки, при этом указанные стимулирующие условия включают присутствие 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, с получением стимулированной композиции; и

(b) введение рекомбинантного рецептора в стимулированную композицию, с получением генетически модифицированной композиции, содержащей генетически модифицированные Т-клетки.

17. Способ по любому из пп. 1-4 и 16, при этом исходная композиция, стимулированная композиция и/или генетически модифицированная композиция содержит первичные CD4+ и/или CD8+ Т-клетки.

18. Способ по любому из пп. 1-4, 16 и 17, при этом исходная композиция, стимулированная композиция и/или генетически модифицированная композиция содержит обогащенные CD4+ Т-клетки.

19. Способ по любому из пп. 1-4, 16 и 17, при этом исходная композиция, стимулированная композиция и/или генетически модифицированная композиция содержит обогащенные CD8+ Т-клетки.

20. Способ получения композиции генетически модифицированных клеток, включающий:

(а) инкубирование в стимулирующих условиях исходной композиции, содержащей Т-клетки, обогащенные по CD4+ или CD8+ первичным человеческим Т-клеткам, при этом



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) средства, ингибирующего активность mTOR; и

(b) введение рекомбинантного рецептора в стимулированную композицию, с получением генетически модифицированной композиции, содержащей генетически модифицированные Т-клетки.

21. Способ по любому из пп. 1-4, 16-18 и 20, при этом исходная композиция, стимулированная композиция и/или генетически модифицированная композиция содержит более или более примерно 70%, более или более примерно 75%, более или более примерно 80%, более или более примерно 85%, более или более примерно 90%, более или более примерно 95%, или более или более примерно 98% CD4+ первичных человеческих Т-клеток; и/или

исходная композиция состоит в основном из CD4+ первичных человеческих Т-клеток.

22. Способ по любому из пп. 1-4, 16 и 18-20, при этом исходная композиция, стимулированная композиция и/или генетически модифицированная композиция содержит более или более примерно 70%, более или более примерно 75%, более или более примерно 80%, более или более примерно 85%, более или более примерно 90%, более или более примерно 95%, или более или более примерно 98% CD8+ первичных человеческих Т-клеток; и/или

исходная композиция состоит в основном из CD8+ первичных человеческих Т-клеток.

23. Способ по любому из пп. 7-22, при этом средство, ингибирующее активность mTOR, представляет собой соединение, малую молекулу, малую органическую молекулу, полинуклеотид, олигонуклеотид, кРНК или полипептид.

24. Способ по любому из пп. 7-23, при этом средство, ингибирующее активность mTOR, ингибирует активность киназы mTORC1 и/или mTORC2.

25. Способ по любому из пп. 7-24, при этом средство, ингибирующее активность mTOR, ингибирует активность по меньшей мере одной дополнительной киназы.

26. Способ по п. 25, при этом по меньшей мере одна дополнительная киназа представляет собой PI3K.

27. Способ по любому из пп. 24-26, при этом средство, ингибирующее активность mTOR, представляет собой BEZ235, BGT226, GDC0980, NVP-BEZ235, PF-04691502, PI103, SAR245409, SF1126, VS5584 или XL765.

28. Способ по любому из пп. 7-27, при этом средство, ингибирующее активность mTOR:

(i) не ингибирует активность PI3K;

(ii) заметно не ингибирует активность PI3K при IC<sub>50</sub> для активности mTOR; и/или

(iii) заметно не ингибирует PI3K при всех концентрациях, заметно ингибирующих активность mTOR.

29. Способ по любому из пп. 7-27 или 28, при этом средство, ингибирующее активность mTOR, ингибирует активность киназы mTORC1 и mTORC2.

30. Способ по любому из пп. 7-27, 28 или 29, при этом средство, ингибирующее активность mTOR, представляет собой пиразолопиримидин, торин 1, торкиниб, PP30, Ku-0063794, WAY-600 (Wyeth), WAY-687 (Wyeth), WAY-354 (Wyeth), OSI-027, DS3078a, AZD8055.

31. Способ по любому из пп. 7-30, при этом средство, ингибирующее активность mTOR, избирательно ингибирует активность mTORC1.

32. Способ по п. 31, при этом средство, ингибирующее активность mTOR:

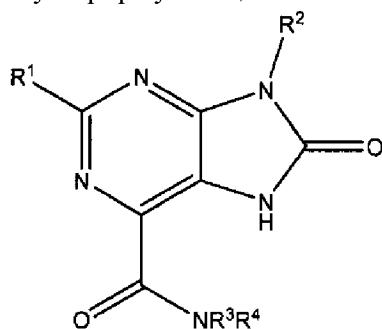
(i) не ингибирует активность mTORC2;

(ii) заметно не ингибирует активность mTORC2 при  $IC_{50}$  для активности mTORC1; и/или

(iii) заметно не ингибирует mTORC2 при всех концентрациях, заметно ингибирующих активность mTORC1.

33. Способ по п. 31 или 32, при этом средство, ингибирующее активность mTOR, представляет собой рапамицин, темсиролимус, эверолимус, дефоролимус или AZD8055.

34. Способ по любому из пп. 7-24, 28 или 29, при этом средство имеет формулу, представленную формулой I,



Формула (I)

где  $R^1$  представляет собой замещенный или незамещенный  $C_{1-8}$  алкил, замещенный или незамещенный арил, замещенный или незамещенный гетероарил, замещенный или незамещенный циклоалкил, или замещенный или незамещенный гетероциклоалкил,

$R^2$  представляет собой замещенный или незамещенный  $C_{1-8}$  алкил, замещенный или незамещенный арил, замещенный или незамещенный гетероарил, замещенный или незамещенный циклоалкил, или замещенный или незамещенный гетероциклоалкил, и

$R^3$  и  $R^4$  независимо представляют собой H или  $C_{1-8}$  алкил.

35. Способ по п. 34, при этом  $R^1$  представляет собой замещенный арил, замещенный или незамещенный гетероарил, такой как замещенный фенил.

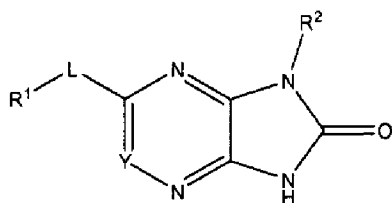
36. Способ по п. 34 или п. 35, при этом  $R^2$  представляет собой замещенный или незамещенный арил, и/или замещенный или незамещенный фенил.

37. Способ по любому из пп. 34-36, при этом группы, которые являются

замещенными, замещены одним или более из групп галогена; C<sub>1-8</sub> алкила; C<sub>2-8</sub> алкенила; C<sub>2-8</sub> алкинила; гидроксила; C<sub>1-8</sub> алкоксила; amino; нитро; тиола; тиоэфира; имина; циано; амидо; фосфонато; фосфина; карбоксила; тиокарбонила; сульфонила; сульфонамида; кетона; альдегида; сложного эфира; карбонила; галоалкила; В(ОН)<sub>2</sub>; карбоциклического циклоалкила, гетероциклоалкила, моноциклического или конденсированного, или не конденсированного полициклического арила или гетероарила; amino; O-низшего алкила; O-арила, арила; арила-низшего алкила; CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>; CONH<sub>2</sub>; OCH<sub>2</sub>CONH<sub>2</sub>; NH<sub>2</sub>; SO<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>; OCHF<sub>2</sub>; CF<sub>3</sub> или OCF<sub>3</sub>.

38. Способ по любому из пп. 7-24, 28 или 29, при этом средство, ингибирующее активность mTOR, представляет собой 2-(3-гидроксифенил)-9-(2-изопропилфенил)-8-оксо-8,9-дигидро-7Н-пурин-6-карбоксамид (соединение 63).

39. Способ по любому из пп. 7-24, 28 или 29, при этом средство имеет формулу, представленную формулой (II),



Формула (II)

где L представляет собой простую связь, NH или O,

Y представляет собой N или CR<sup>3</sup>,

при этом R<sup>1</sup> представляет собой H, замещенный или незамещенный C<sub>1-8</sub> алкил, замещенный или незамещенный C<sub>2-8</sub> алкенил, замещенный или незамещенный арил, замещенный или незамещенный гетероарил, замещенный или незамещенный циклоалкил, или замещенный или незамещенный гетероциклоалкил,

R<sup>2</sup> представляет собой H, замещенный или незамещенный C<sub>1-8</sub> алкил, замещенный или незамещенный арил, замещенный или незамещенный гетероарил, замещенный или незамещенный циклоалкил, или замещенный или незамещенный гетероциклоалкил,

R<sup>3</sup> представляет собой H, замещенный или незамещенный C<sub>1-8</sub> алкил, замещенный или незамещенный арил, замещенный или незамещенный гетероарил, замещенный или незамещенный циклоалкил, замещенный или незамещенный гетероциклоалкил, -NHR<sup>4</sup> или -N(R<sup>4</sup>)<sub>2</sub>, и

R<sup>4</sup> в каждом случае независимо представляет собой замещенный или незамещенный C<sub>1-8</sub> алкил, замещенный или незамещенный арил, замещенный или незамещенный гетероарил, замещенный или незамещенный циклоалкил, или замещенный или незамещенный гетероциклоалкил.

40. Способ по п. 39, при этом R<sup>1</sup> представляет собой замещенный арил и/или замещенный фенил.

41. Способ по п. 39 или п. 40, при этом Y представляет собой CH.

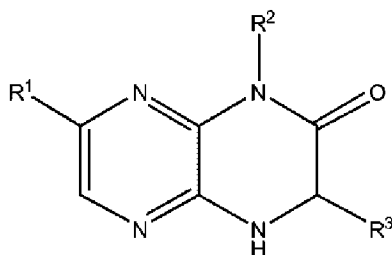
42. Способ по любому из пп. 39-41, при этом L представляет собой простую связь.

43. Способ по любому из пп. 39-42, при этом  $R^1$  представляет собой замещенный арил, и  $R^2$  представляет собой  $C_{1-8}$  алкил, замещенный одним или более заместителями, выбранными из алкокси, amino, гидроксид, циклоалкила или гетероциклоалкила.

44. Способ по п. 43, при этом  $R^2$  представляет собой  $C_{1-8}$  алкил, замещенный гетероциклоалкилом.

45. Способ по любому из пп. 1-19, 23, 24 или 34-39, при этом средство, ингибирующее активность mTOR, представляет собой соединение 155.

46. Способ по любому из пп. 7-24, 28 или 29, при этом средство имеет формулу, представленную формулой III



### Формула (III)

где  $R^1$  представляет собой замещенный или незамещенный  $C_{1-8}$  алкил, замещенный или незамещенный арил, замещенный или незамещенный циклоалкил, замещенный или незамещенный гетероцикл, или замещенный или незамещенный гетероциклилалкил,

$R^2$  представляет собой H, замещенный или незамещенный  $C_{1-8}$  алкил, замещенный или незамещенный циклоалкил, замещенный или незамещенный гетероцикл, замещенный или незамещенный гетероциклилалкил, замещенный или незамещенный аралкил, или замещенный или незамещенный циклоалкилалкил, и

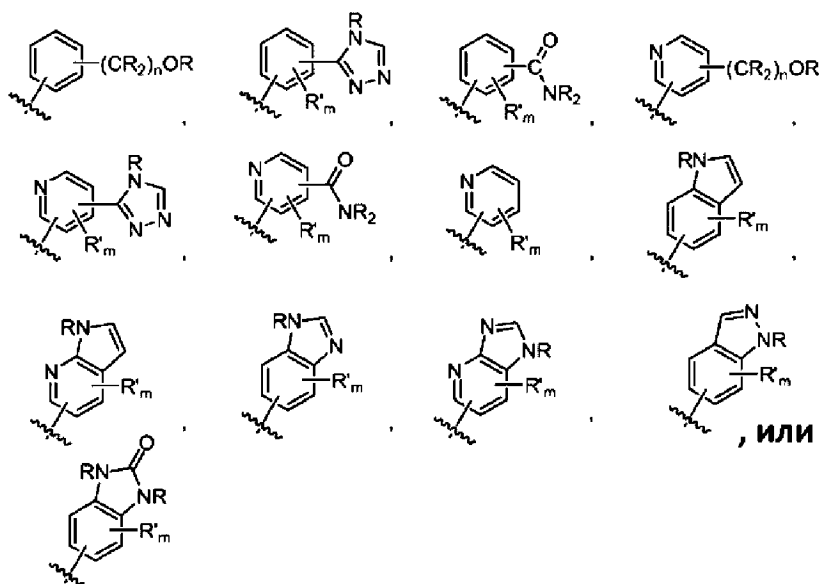
$R^3$  представляет собой H, или замещенный или незамещенный  $C_{1-8}$  алкил.

47. Способ по п. 46, при этом  $R^1$  представляет собой замещенный или незамещенный арил, или замещенный или незамещенный гетероарил.

48. Способ по п. 46 или п. 47, при этом  $R^1$  представляет собой пиридил, который является замещенным.

49. Способ по любому из пп. 46-48, при этом  $R^1$  представляет собой пиридил, замещенный одним или более заместителями, независимо выбранными из группы, состоящей из замещенного или незамещенного  $C_{1-8}$  алкила, замещенного или незамещенного гетероциклила, галогена, аминокарбонила, циано, гидроксиалкила, -OR и -NR<sub>2</sub>, где каждый R независимо представляет собой H, или замещенный или незамещенный  $C_{1-4}$  алкил. В конкретных вариантах осуществления  $R^1$  представляет собой 1H-пирроло[2,3-b]пиридил или бензимидазол, необязательно замещенный одним или более заместителями, независимо выбранными из группы, состоящей из замещенного или незамещенного  $C_{1-8}$  алкила и -NR<sub>2</sub>, где R независимо представляет собой H, или замещенный или незамещенный  $C_{1-4}$  алкил.

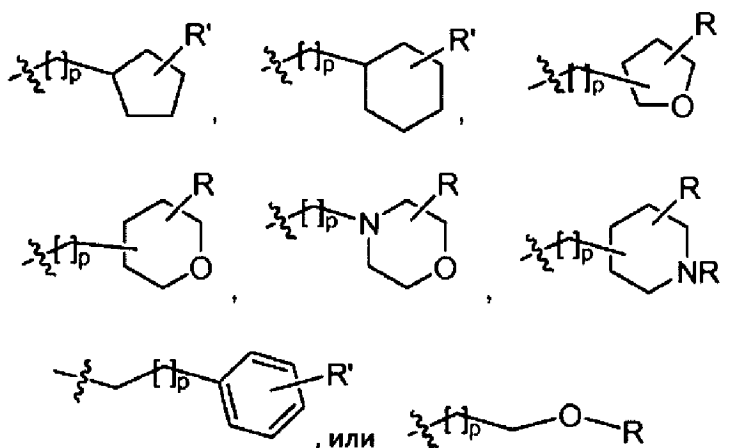
50. Способ по любому из пп. 46-49, при этом  $R^1$  представляет собой



где R в каждом случае независимо представляет собой H, или замещенный или незамещенный C<sub>1-4</sub> алкил (например, метил); R<sup>1</sup> в каждом случае независимо представляет собой замещенный или незамещенный C<sub>1-4</sub> алкил, галоген, циано, -OR или -NR<sub>2</sub>; m равно 0-3 и n равно 0-3.

51. Способ по любому из пп. 46-50, при этом R<sup>2</sup> представляет собой H, метил, этил, н-пропил, изопропил, н-бутил, втор-бутил, изобутил, трет-бутил, н-пентил, изопентил, циклопентил, циклогексил, тетрагидрофуранил, тетрагидропиранил, (C<sub>1-4</sub> алкил)фенил, (C<sub>1-4</sub> алкил)циклопропил, (C<sub>1-4</sub> алкил)циклобутил, (C<sub>1-4</sub> алкил)циклопентил, (C<sub>1-4</sub> алкил)циклогексил, (C<sub>1-4</sub> алкил)пирролидил, (C<sub>1-4</sub> алкил)пиперидил, (C<sub>1-4</sub> алкил)пиперазинил, (C<sub>1-4</sub> алкил)морфолинил, (C<sub>1-4</sub> алкил)тетрагидрофуранил или (C<sub>1-4</sub> алкил)тетрагидропиранил, каждый, необязательно, замещенный.

52. Способ по любому из пп. 46-50, при этом R<sup>2</sup> представляет собой H, C<sub>1-4</sub> алкил, (C<sub>1-4</sub> алкил)(OR),



где R в каждом случае независимо представляет собой H, или замещенный или незамещенный C<sub>1-8</sub> алкил, R' в каждом случае независимо представляет собой H, -OR, циано, или замещенный или незамещенный C<sub>1-8</sub> алкил и p равно 0-3.

53. Способ по любому из пп. 7-24, 28 или 29, или 46-52, при этом средство, ингибирующее активность mTOR, представляет собой 7-(6-(2-гидроксипропан-2-ил)пиридин-3-ил)-1-((1r,4r)-4-метоксициклогексил)-3,4-дигидропиразино[2,3-b]пиразин-2(1H)-он (соединение 246).

54. Способ по любому из пп. 5-6 и 38, при этом средство, ингибирующее активность mTOR, представляет собой соединение 63, и композицию генетически модифицированных клеток культивируют в присутствии соединения 63 в концентрации от 500 нМ до 2 мкМ, от 1 нМ до 100 нМ, от 50 нМ до 250 нМ или от 100 нМ до 500 нМ.

55. Способ по любому из пп. 1-4 и 38, при этом средство, ингибирующее активность mTOR, представляет собой соединение 63, и композицию генетически модифицированных клеток инкубируют в присутствии соединения 63 в концентрации от 500 нМ до 2 мкМ, от 1 нМ до 100 нМ, от 50 нМ до 250 нМ или от 100 нМ до 500 нМ.

56. Способ по любому из пп. 1-4 и 45, при этом средство, ингибирующее активность mTOR, представляет собой соединение 155, и композицию генетически модифицированных клеток инкубируют в присутствии соединения 155 в концентрации от 500 нМ до 2 мкМ, от 1 нМ до 100 нМ, от 50 нМ до 250 нМ или от 100 нМ до 500 нМ.

57. Способ по любому из пп. 5-6 и 38, при этом средство, ингибирующее активность mTOR, представляет собой соединение 155, и композицию генетически модифицированных клеток культивируют в присутствии соединения 155 в концентрации от 500 нМ до 2 мкМ, от 1 нМ до 100 нМ, от 50 нМ до 250 нМ или от 100 нМ до 500 нМ.

58. Способ по любому из пп. 1-4 и 53, при этом средство, ингибирующее активность mTOR, представляет собой соединение 246, и композицию генетически модифицированных клеток инкубируют в присутствии соединения 246 в концентрации от 500 нМ до 2 мкМ, от 1 нМ до 100 нМ, от 50 нМ до 250 нМ или от 100 нМ до 500 нМ.

59. Способ по любому из пп. 5-6 и 53, при этом средство, ингибирующее активность mTOR, представляет собой соединение 246, и композицию генетически модифицированных клеток культивируют в присутствии соединения 246 в концентрации от 500 нМ до 2 мкМ, от 1 нМ до 100 нМ, от 50 нМ до 250 нМ или от 100 нМ до 500 нМ.

60. Способ по любому из пп. 1-4 и 16-58, при этом стимулирующий реагент включает первичное средство, которое специфически связывает компонент комплекса TCR, необязательно, которое специфически связывает CD3.

61. Способ по п. 60, при этом стимулирующий реагент также включает вторичное средство, которое специфически связывает Т-клеточную костимулирующую молекулу, необязательно, при этом костимулирующую молекулу выбирают из CD28, CD137 (4-1-BB), OX40 или ICOS.

62. Способ по п. 60 или п. 61, при этом первичное и/или вторичное средства включают антитело, необязательно, при этом использование стимулирующего реагента включает инкубацию с анти-CD3 антителом и анти-CD28 антителом, или их антигенсвязывающими фрагментами.

63. Способ по любому из пп. 59-61, при этом первичное средство и/или вторичное

средство находятся на поверхности твердой подложки, необязательно, при этом твердая подложка представляет собой или включает гранулу.

64. Способ по п. 63, при этом гранула имеет диаметр более или более примерно 3,5 мкм, но не более примерно 9 мкм, или не более примерно 8 мкм, или не более примерно 7 мкм, или не более примерно 6 мкм, или не более примерно 5 мкм.

65. Способ по п. 63 или п. 64, при этом гранула имеет диаметр, составляющий или составляющий примерно 4,5 мкм.

66. Способ по любому из пп. 63-65, при этом гранула является инертной.

67. Способ по любому из пп. 63-66, при этом гранула представляет собой или имеет полистирольную поверхность.

68. Способ по любому из пп. 63-67, при этом гранула является магнитной или суперпарамагнитной.

69. Способ по любому из пп. 63-68, при этом соотношение гранул и клеток составляет от или от примерно 4:1 до 0,25:1.

70. Способ по любому из пп. 1-4 и 16-69, при этом введение включает трансдукцию клеток стимулированной композиции вирусным вектором, содержащим полинуклеотид, кодирующий рекомбинантный рецептор.

71. Способ по п. 70, при этом вирусный вектор представляет собой ретровирусный вектор.

72. Способ по п. 70 или п. 71, при этом вирусный вектор представляет собой лентивирусный вектор или гамма-ретровирусный вектор.

73. Способ по любому из пп. 2-72, дополнительно включающий сбор клеток произведенной композиции.

74. Способ по любому из пп. 2-73, дополнительно включающий формулирование клеток произведенной композиции для криоконсервации и/или введения субъекту, необязательно, в присутствии фармацевтически приемлемого эксципиента.

75. Способ по п. 74, при этом клетки произведенной композиции формулируют в присутствии криопротектора.

76. Способ по п. 75, при этом криопротектор включает ДМСО.

77. Способ по любому из пп. 74-76, при этом клетки произведенной композиции формулируют в контейнере, необязательно, флаконе или мешке.

78. Способ по любому из пп. 1-4 и 16-77, дополнительно включающий выделение CD4+ и/или CD8+ Т-клеток из биологического образца перед инкубацией.

79. Способ по п. 78, при этом выделение включает селекцию клеток на основе поверхностной экспрессии CD4 и/или CD8, необязательно, методом положительной или отрицательной селекции.

80. Способ по п. 78 или п. 79, при этом выделение включает проведение основанной на иммунной аффинности селекции.

81. Способ по любому из пп. 78-80, при этом биологический образец содержит первичные Т-клетки, полученные от субъекта.

82. Способ по любому из пп. 78-81, при этом биологический образец представляет собой или включает образец цельной крови, образец лейкоцитарной пленки, образец моноклеарных клеток периферической крови (МКПК), образец не фракционированных Т-клеток, образец лимфоцитов, образец белых клеток крови, продукт афереза или продукт лейкофереза.

83. Способ по любому из пп. 1-82, при этом рекомбинантный рецептор способен связывать антиген-мишень, который связан с, специфичен для, и/или экспрессируется на клетке или ткани, связанной с заболеванием, нарушением или состоянием.

84. Способ по п. 83, при этом заболевание, нарушение или состояние представляет собой инфекционное заболевание или нарушение, аутоиммунное заболевание, воспалительное заболевание, либо опухоль или рак.

85. Способ по п. 83 или п. 84, при этом антиген-мишень представляет собой опухолевый антиген.

86. Способ по любому из пп. 83-85, при этом антиген-мишень выбирают из 5T4, 8H9, интегрин  $\alpha\beta6$ , B7-H6, антигена созревания В-клеток (BCMA), CA9, раково-тестикулярного антигена, карбоангидразы 9 (CAIX), CCL-1, CD19, CD20, CD22, CEA, поверхностного антигена вируса гепатита В, CD23, CD24, CD30, CD33, CD38, CD44, CD44v6, CD44v7/8, CD123, CD138, CD171, карциноэмбрионального антигена (CEA), 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, рецептора эстрогена, эмбрионального AchR, фолатного рецептора альфа, фолат-связывающего белка (FBP), FCRL5, FCRH5, эмбрионального ацетилхолинового рецептора, G250/CAIX, GD2, GD3, связанного с G-белками рецептора 5D (GPCR5D), gp100, Her2/neu (рецептора тирозинкиназы erbB2), HMW-MAA, IL-22R-альфа, IL-13 рецептора альфа 2 (IL-13Ra2), рецептора домена киназной вставки (kdr), легкой цепи каппа, Lewis Y, L1-молекулы клеточной адгезии (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), онкоэмбрионального антигена, предпочтительно экспрессируемого антигена меланомы (PRAME), PSCA, рецептора прогестерона, сурвивина, ROR1, TAG72, tEGFR, рецепторов VEGF, VEGF-R2, антигена опухоли Вильмса 1 (WT-1), специфического для патогена антигена и антигена, связанного с универсальным маркером.

87. Способ по любому из пп. 1-86, при этом рекомбинантный рецептор представляет собой или включает функциональный не-TCR антигенный рецептор или TCR, или их антигенсвязывающие фрагменты.

88. Способ по любому из пп. 1-87, при этом рекомбинантный рецептор представляет собой химерный антигенный рецептор (CAR).

89. Способ по любому из пп. 1-88, при этом рекомбинантный рецептор представляет собой анти-CD19 CAR.



90. Способ по п. 89, при этом химерный антигенный рецептор содержит внеклеточный домен, содержащий антигенсвязывающий домен, и внутриклеточную сигнальную область, содержащую внутриклеточный сигнальный домен.

91. Способ по п. 90, при этом антигенсвязывающий домен представляет собой или включает антитело или фрагмент антитела, который, необязательно, представляет собой одноцепочечный фрагмент.

92. Способ по п. 91, при этом фрагмент содержит переменные области антитела, соединенные гибким линкером.

93. Способ по п. 91 или п. 92, при этом фрагмент представляет собой scFv.

94. Способ по любому из пп. 91-93, при этом химерный антигенный рецептор дополнительно содержит трансмембранный домен между внеклеточным доменом и внутриклеточной сигнальной областью.

95. Способ по любому из пп. 91-94, при этом химерный антигенный рецептор дополнительно содержит спейсер между антигенсвязывающим доменом и трансмембранным доменом, необязательно, при этом спейсер представляет собой фрагмент константной области иммуноглобулина, необязательно, при этом фрагмент представляет собой или включает шарнирную область.

96. Способ по любому из пп. 90-95, при этом внутриклеточный сигнальный домен представляет собой или включает основной сигнальный домен, сигнальный домен, способный индуцировать основной сигнал активации в Т-клетке, сигнальный домен компонента Т-клеточного рецептора (TCR) и/или сигнальный домен, содержащий иммунорецепторный тирозиновый активирующий мотив (ITAM).

97. Способ по п. 96, при этом внутриклеточный сигнальный домен представляет собой или включает внутриклеточный сигнальный домен цепи CD3, необязательно, дзета-цепи CD3 (CD3 $\zeta$ ), или его сигнальный фрагмент.

98. Способ по любому из пп. 90-97, при этом внутриклеточная сигнальная область дополнительно содержит костимулирующую сигнальную область.

99. Способ по п. 98, при этом костимулирующая сигнальная область содержит внутриклеточный сигнальный домен Т-клеточной костимулирующей молекулы, или его сигнальный фрагмент.

100. Способ по п. 98 или п. 99, при этом костимулирующая сигнальная область содержит внутриклеточный сигнальный домен CD28, 4-1BB или ICOS, или его сигнальный фрагмент.

101. Способ по любому из пп. 98-100, при этом костимулирующая сигнальная область находится между трансмембранным доменом и внутриклеточной сигнальной областью.

102. Способ по любому из пп. 1-4 и 15-101, при этом первичные Т-клетки включают отдельные композиции обогащенных CD4<sup>+</sup> Т-клеток и обогащенных CD8<sup>+</sup> Т-клеток, и при этом композиции обогащенных CD4<sup>+</sup> Т-клеток и обогащенных CD8<sup>+</sup> Т-клеток инкубируют отдельно.

103. Способ по любому из пп. 5-16 и 23-101, при этом первичные Т-клетки включают отдельные композиции обогащенных CD4<sup>+</sup> Т-клеток и обогащенных CD8<sup>+</sup> Т-клеток, и при этом композиции обогащенных CD4<sup>+</sup> Т-клеток и обогащенных CD8<sup>+</sup> Т-клеток культивируют отдельно.

104. Композиция, содержащая генетически модифицированные клетки, полученные способом по любому из пп. 1-103.

105. Композиция по п. 104, дополнительно содержащая фармацевтически приемлемый носитель.

106. Композиция по п. 104 или п. 105, содержащая криопротектор, необязательно, ДМСО.

107. Изделие, включающее композицию по любому из пп. 104-106 и инструкции по введению произведенной композиции субъекту.

108. Изделие по п. 107, при этом субъект имеет заболевание или состояние, необязательно, при этом рекомбинантный рецептор специфически узнает или специфически связывает антиген, связанный с, или экспрессируемый, или присутствующий на клетках, связанных с заболеванием или состоянием.

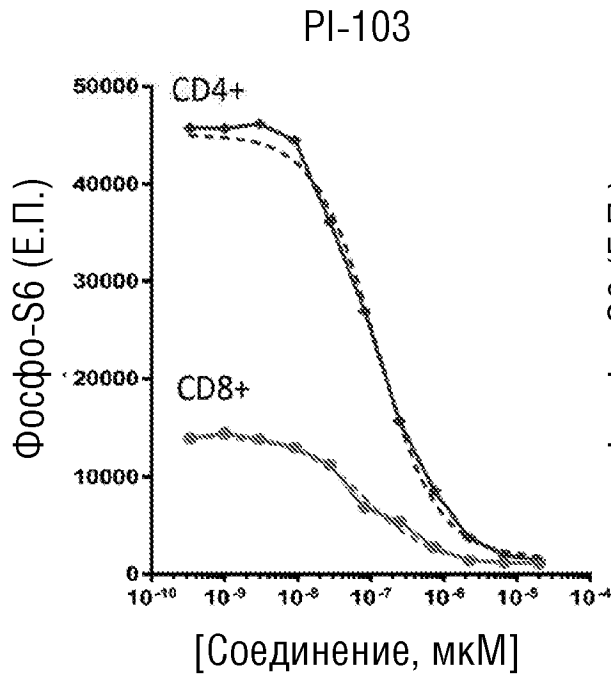
109. Изделие по п. 107 или п. 108, при этом произведенная композиция представляет собой композицию генетически модифицированных CD4<sup>+</sup> Т-клеток.

110. Изделие по п. 107 или п. 108, при этом произведенная композиция представляет собой композицию генетически модифицированных CD8<sup>+</sup> Т-клеток.

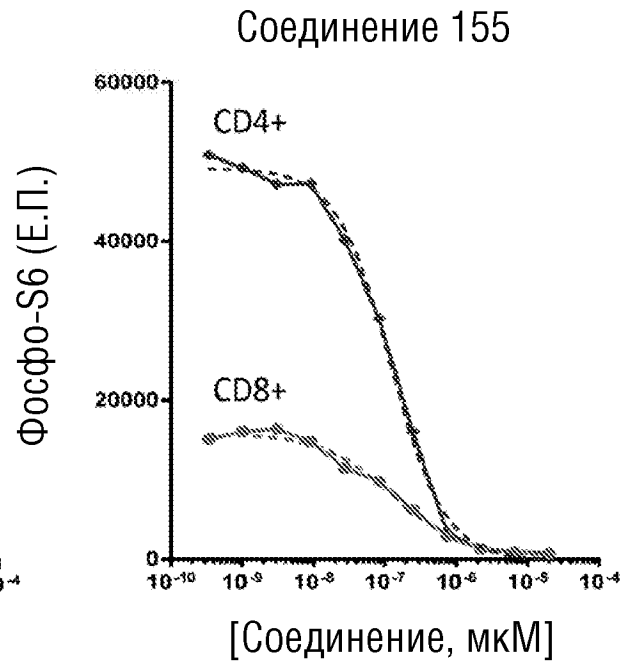
111. Изделие по п. 107 или п. 108, при этом произведенная композиция представляет собой композицию генетически модифицированных CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-клеток.

По доверенности

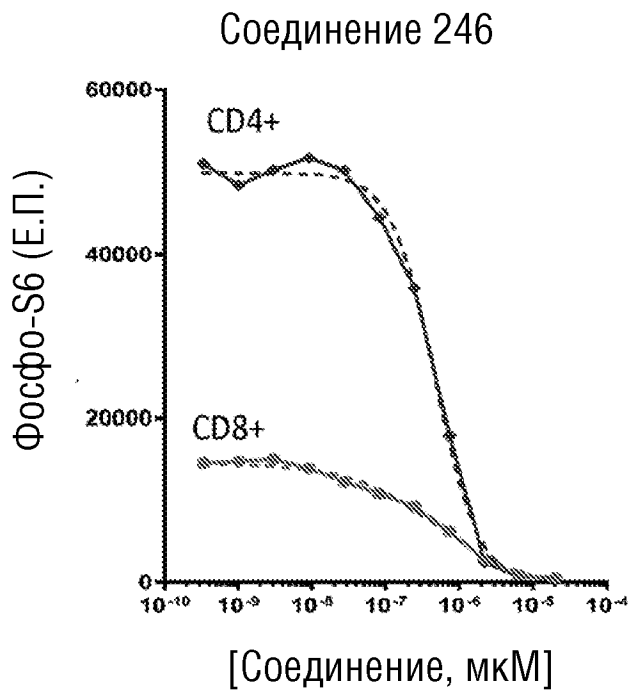
ФИГ.1А



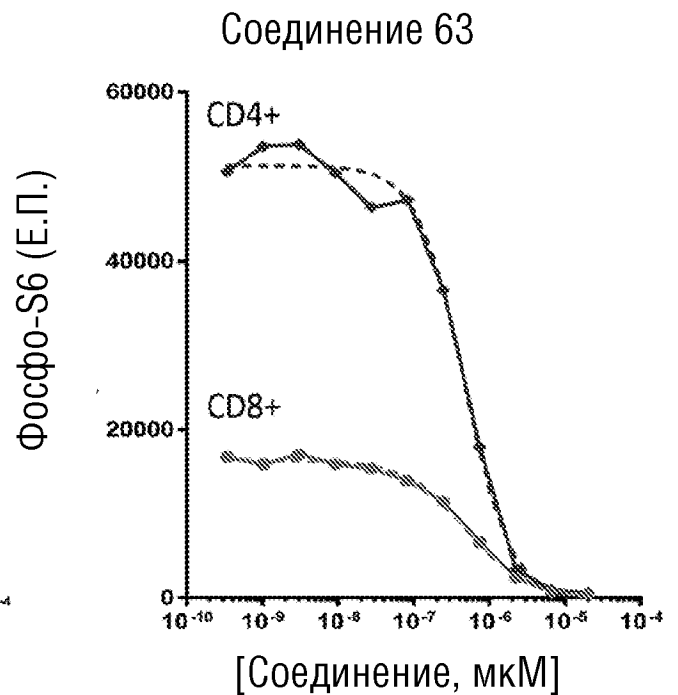
ФИГ.1В



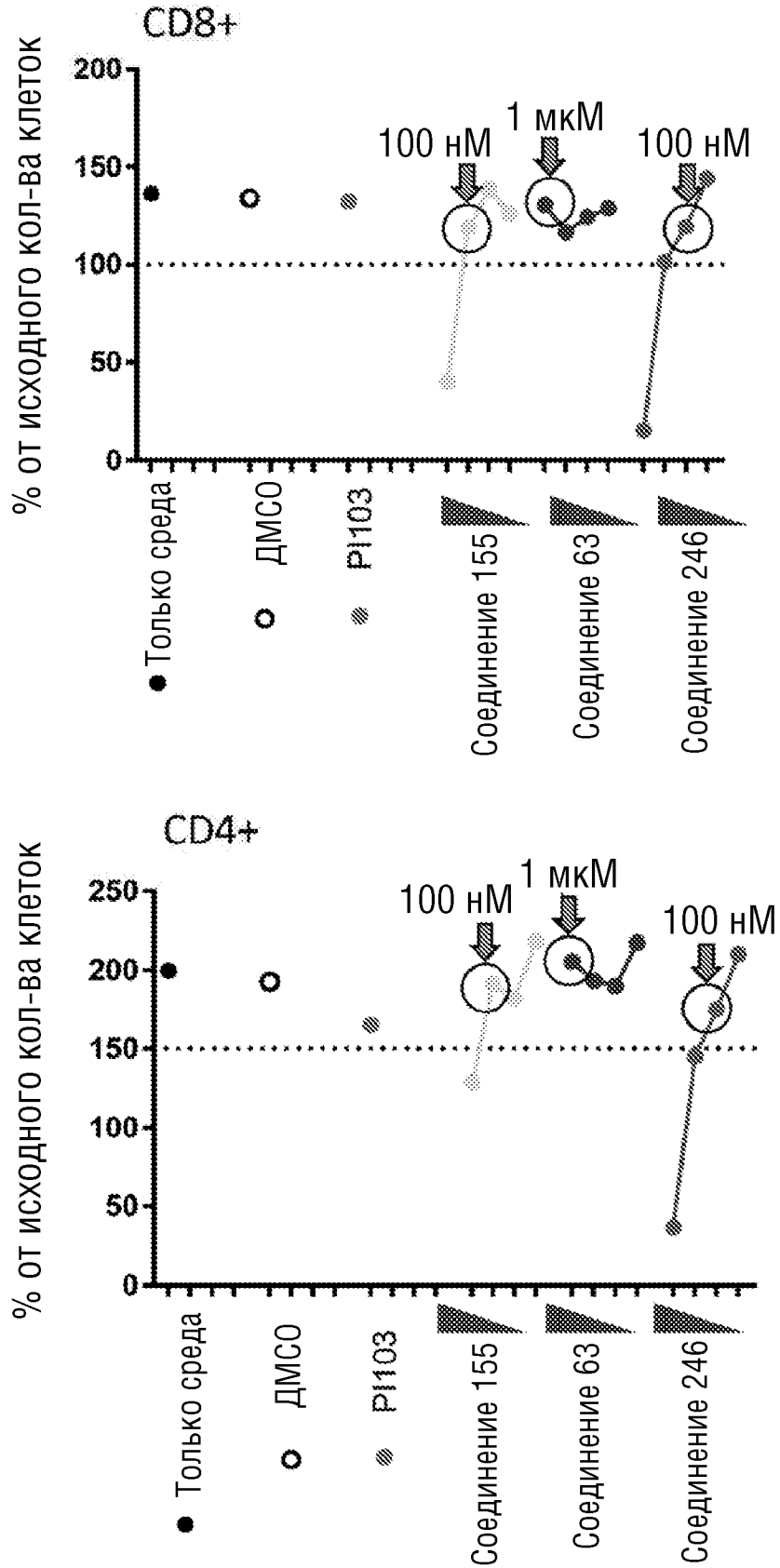
ФИГ.1С



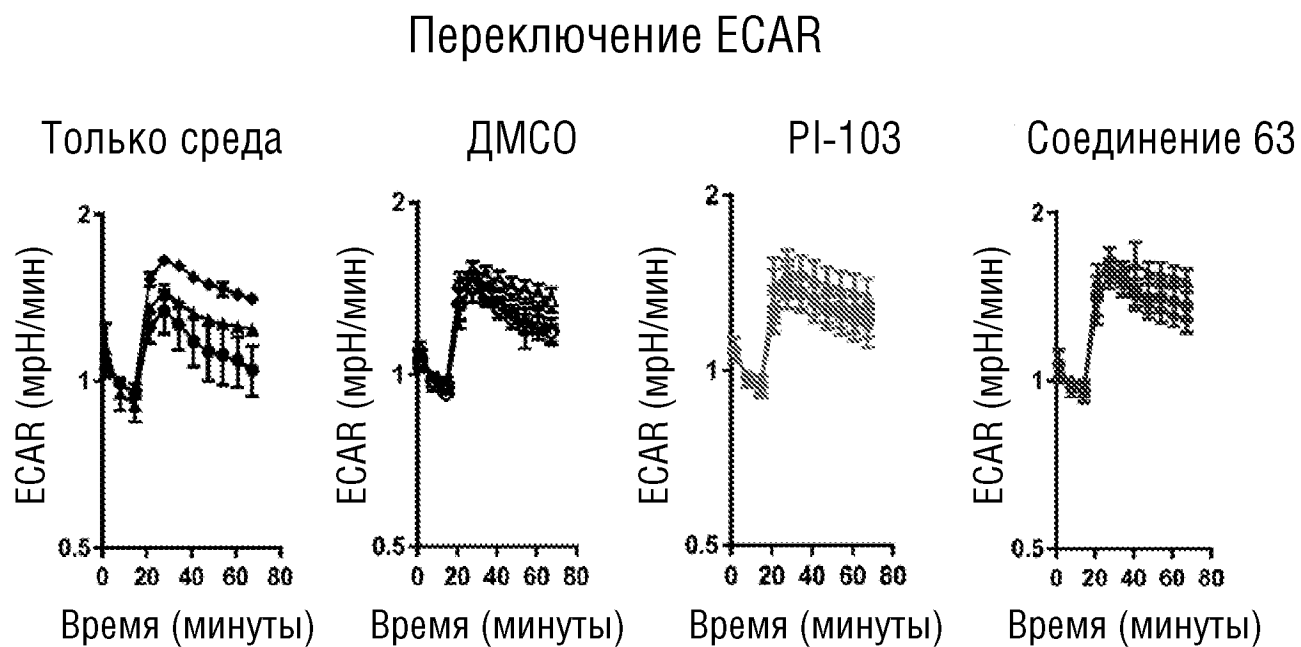
ФИГ.1D



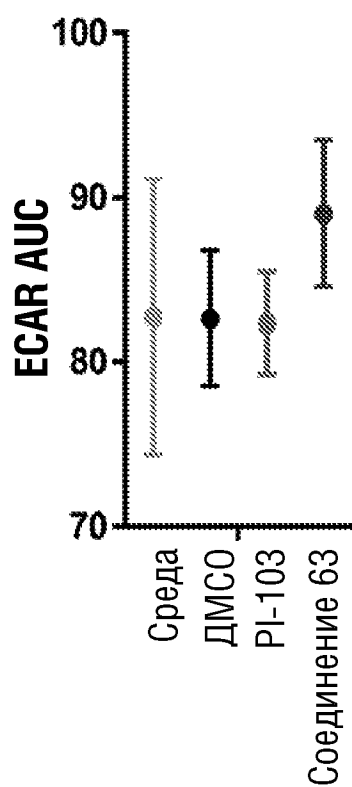
ФИГ.2



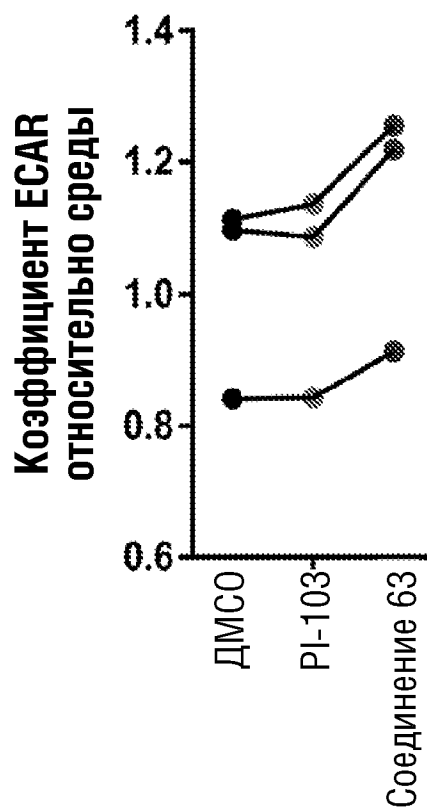
ФИГ.3А



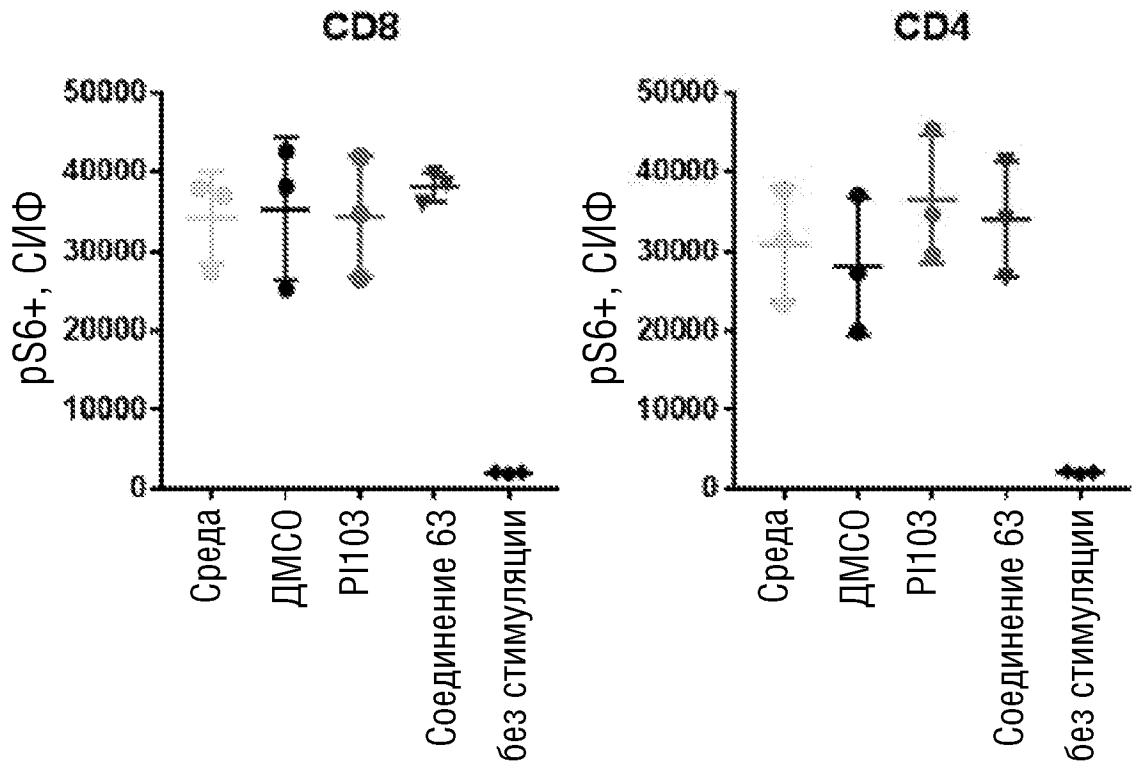
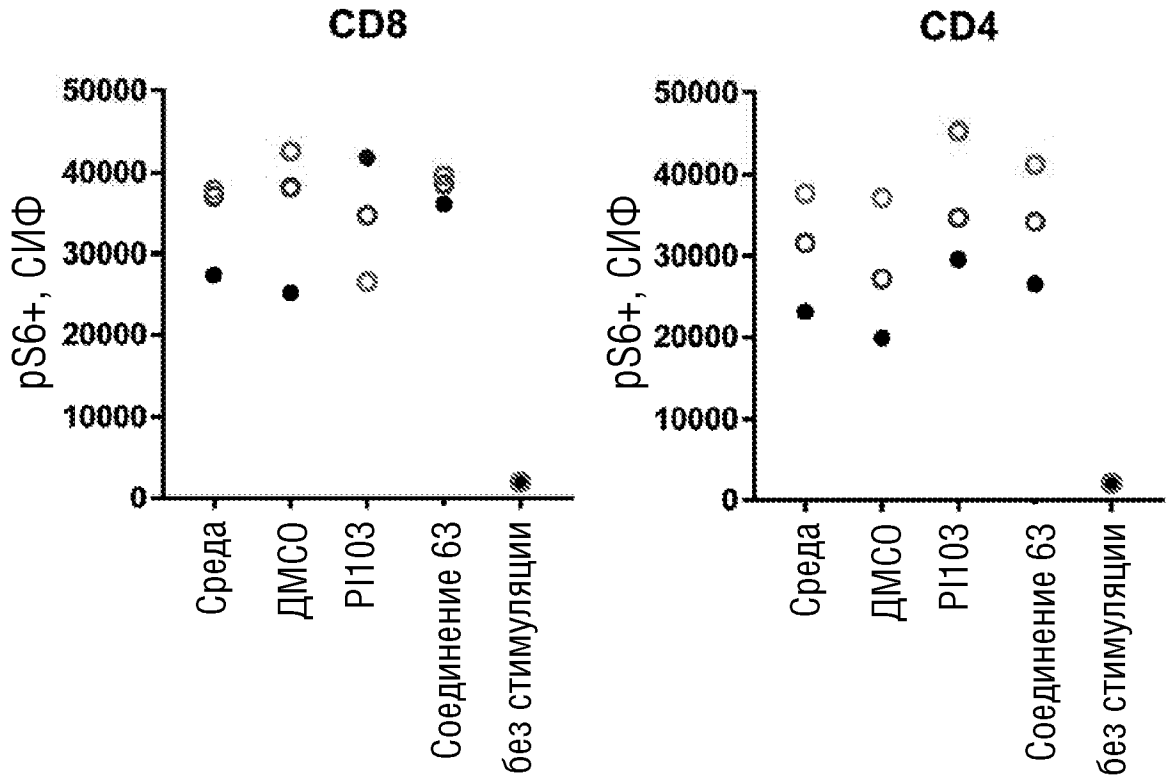
ФИГ.3В



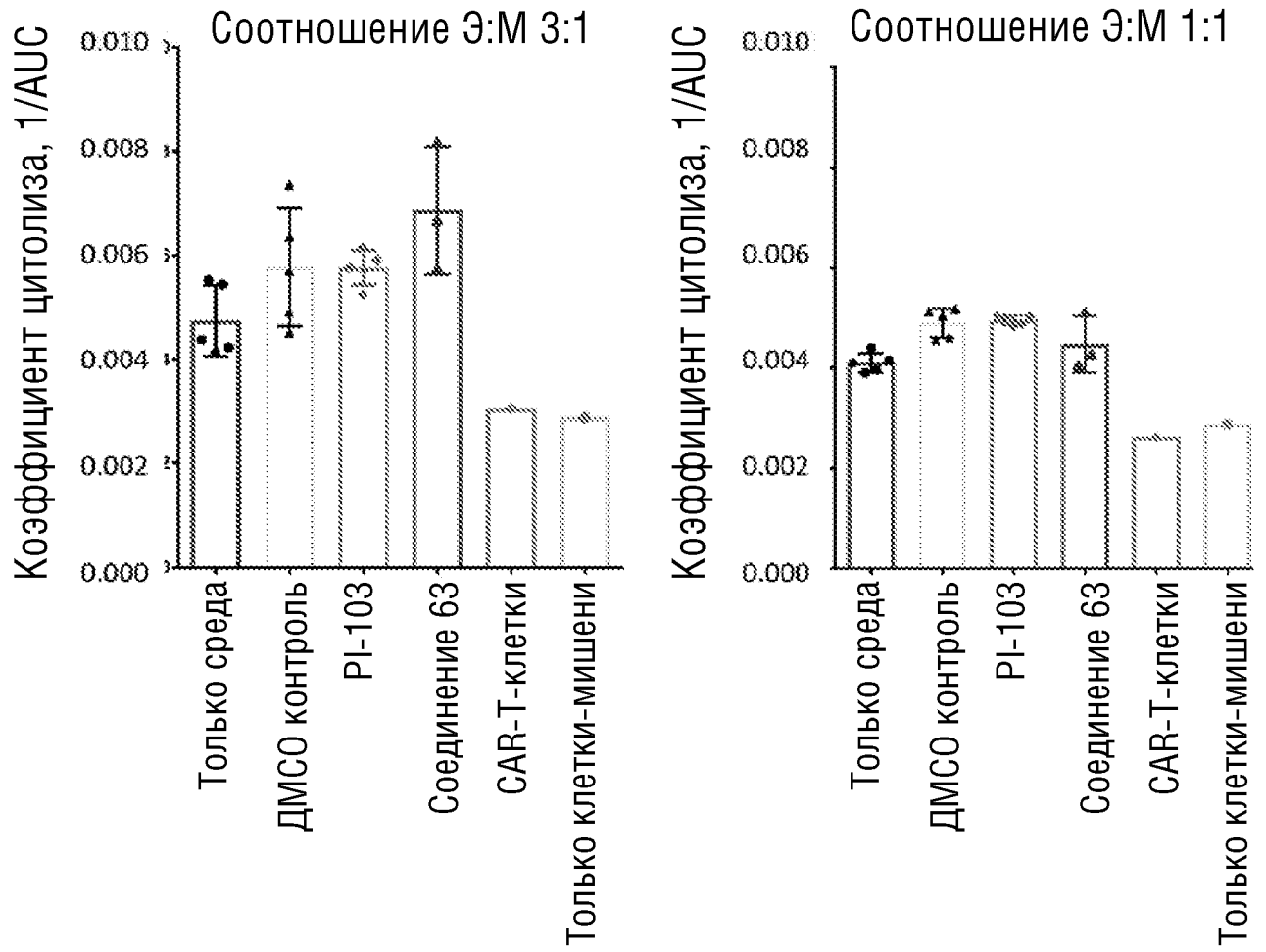
ФИГ.3С



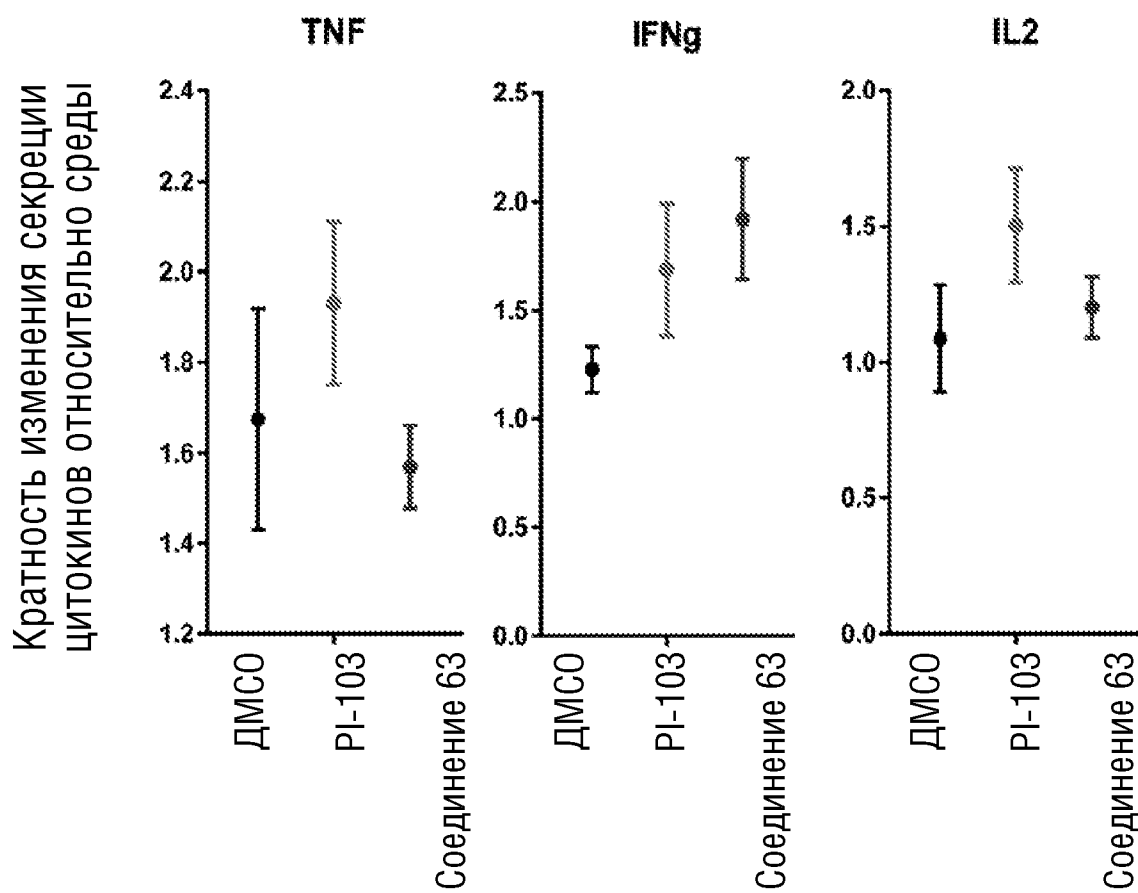
ФИГ.4А



ФИГ.4В



ФИГ.5





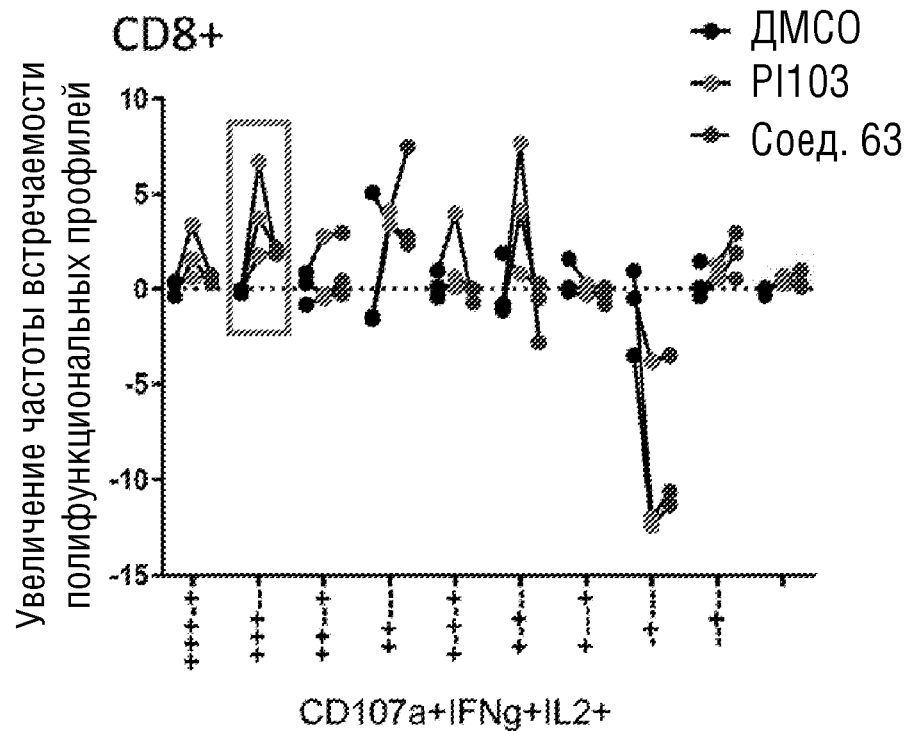
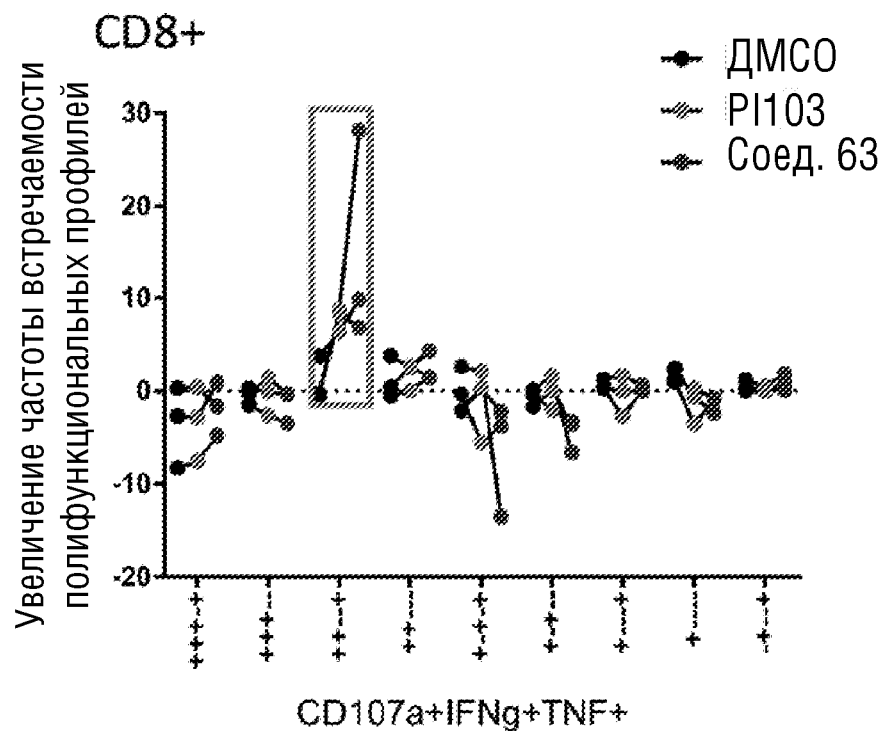
ФИГ.6А

Сочетания:

- + TNF
- + IL17a
- + IL2
- + IFNg
- + CD107a

Стимуляция PI CD19+

Ингибитор аппарата Гольджи CD19+



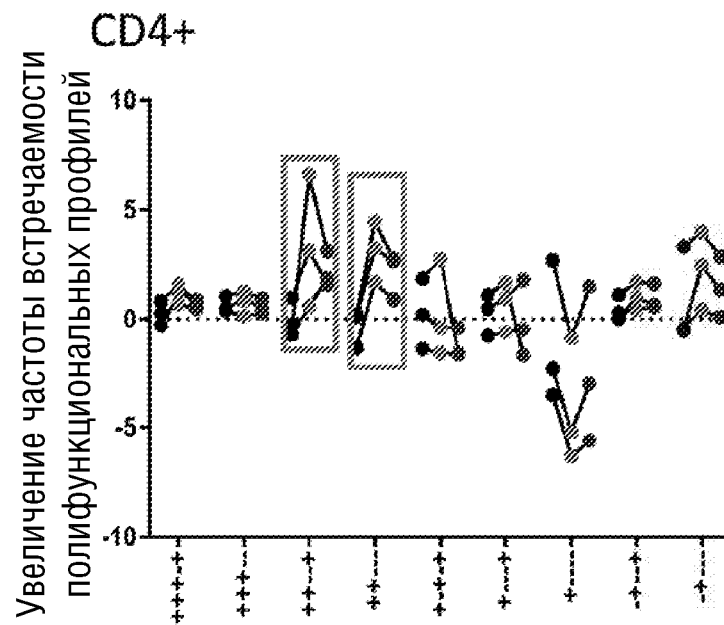
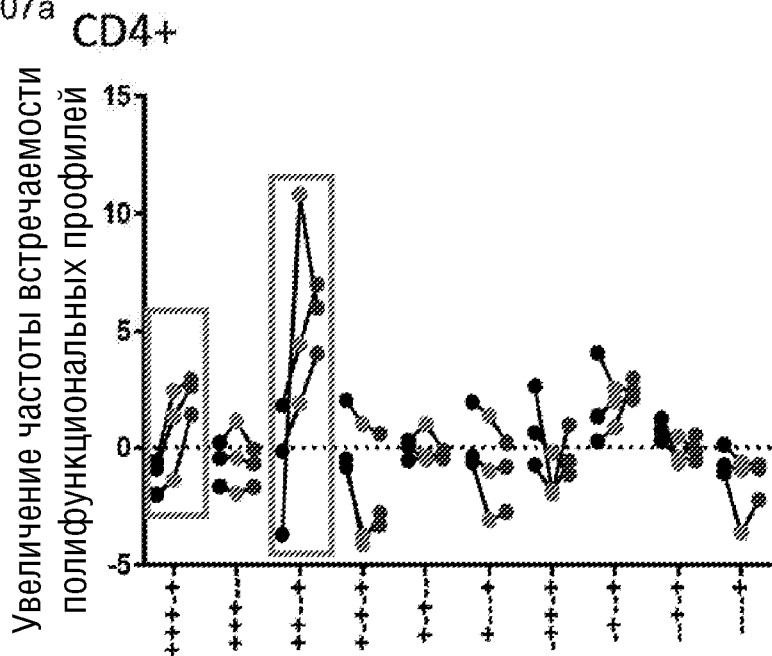
# ФИГ.6В

Сочетания:

- + TNF
- + IL17a
- + IL2
- + IFNg
- + CD107a

Стимуляция PI CD19+

Ингибитор аппарата Гольджи CD19+

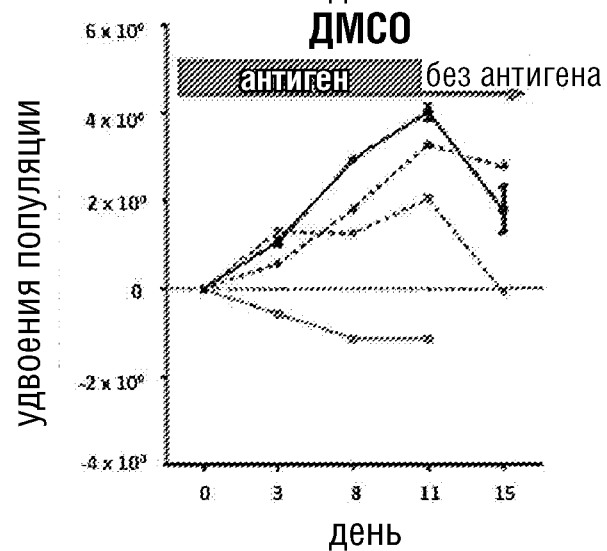
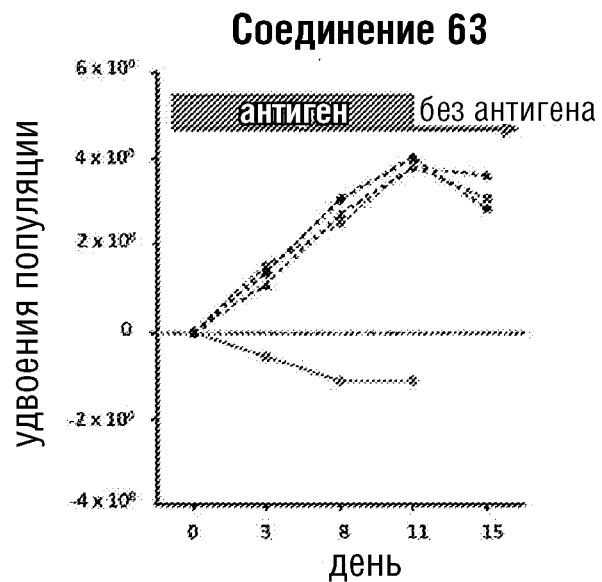
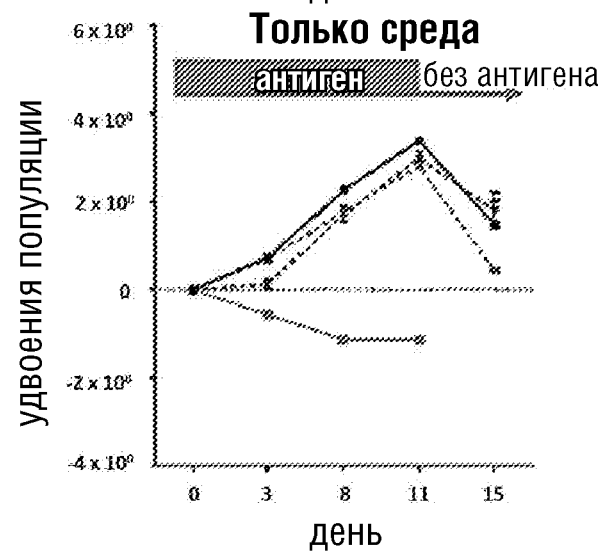
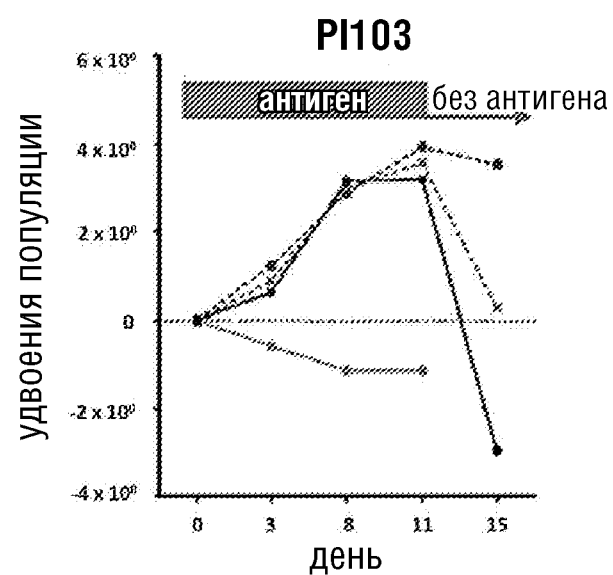


- ДМСО 8/33
- ▨ PI103
- Соед. 63

CD107a+IFNg+IL2+TNF+ CD107a+IFNg+TNF+

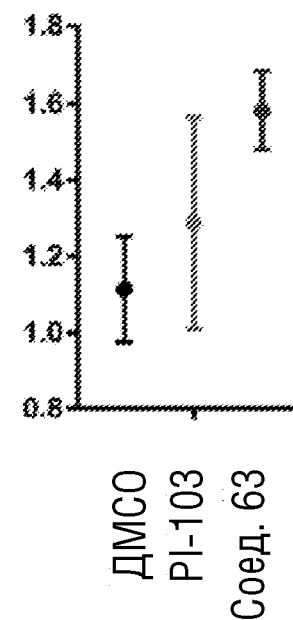
CD107a+IFNg+TNF+ CD107a+IFNg+

ФИГ.7А

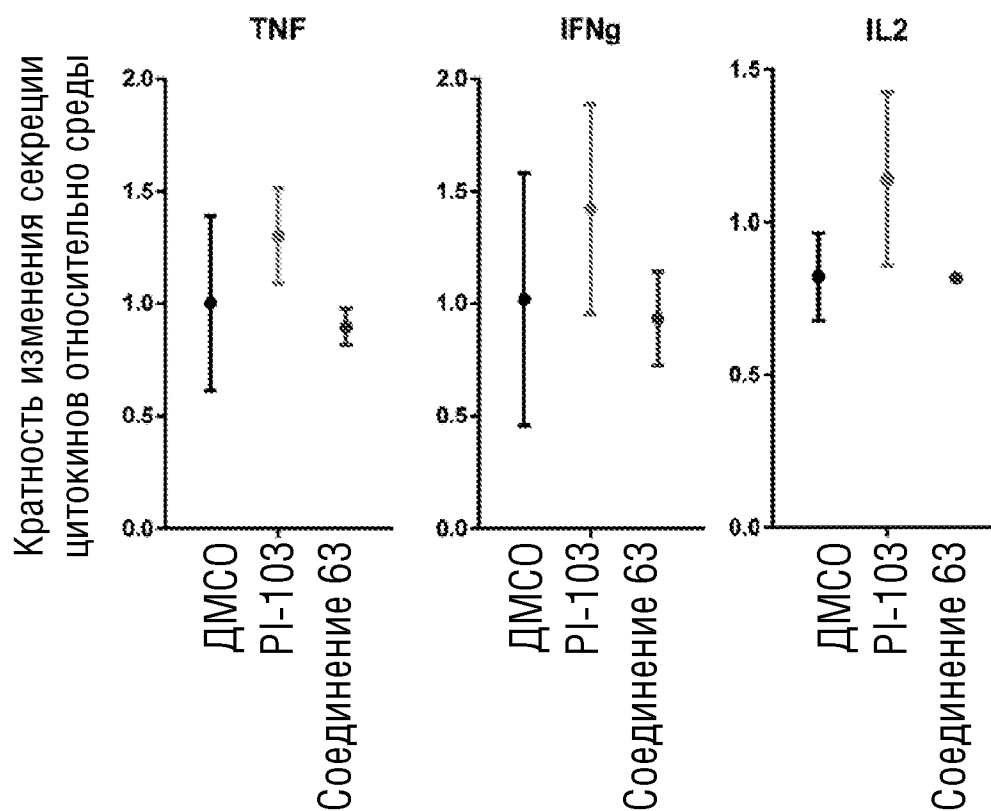


ФИГ.7В

АУС относительно среды



ФИГ.7С

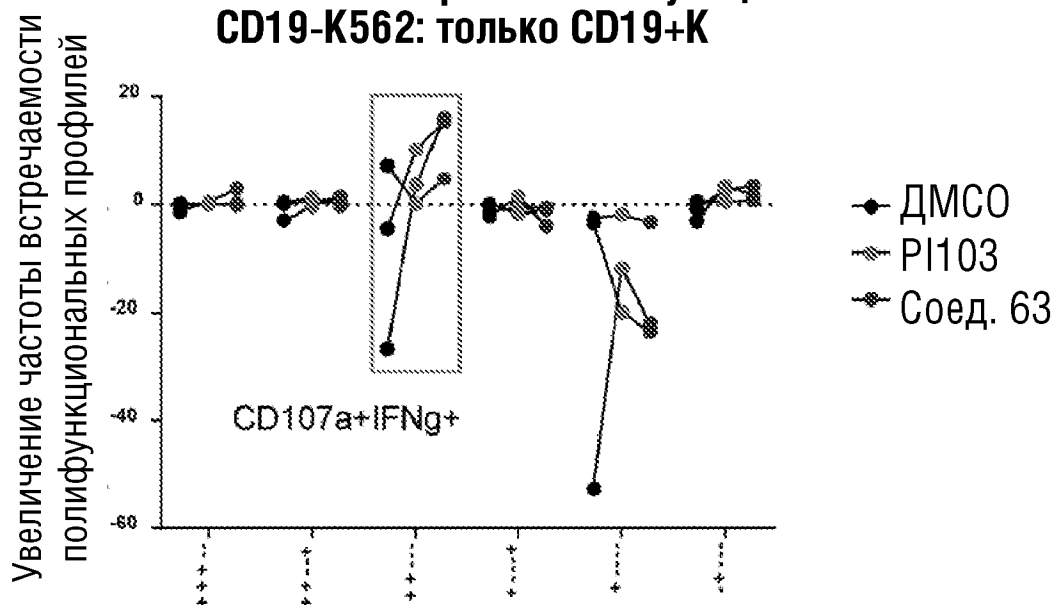


ФИГ.7D

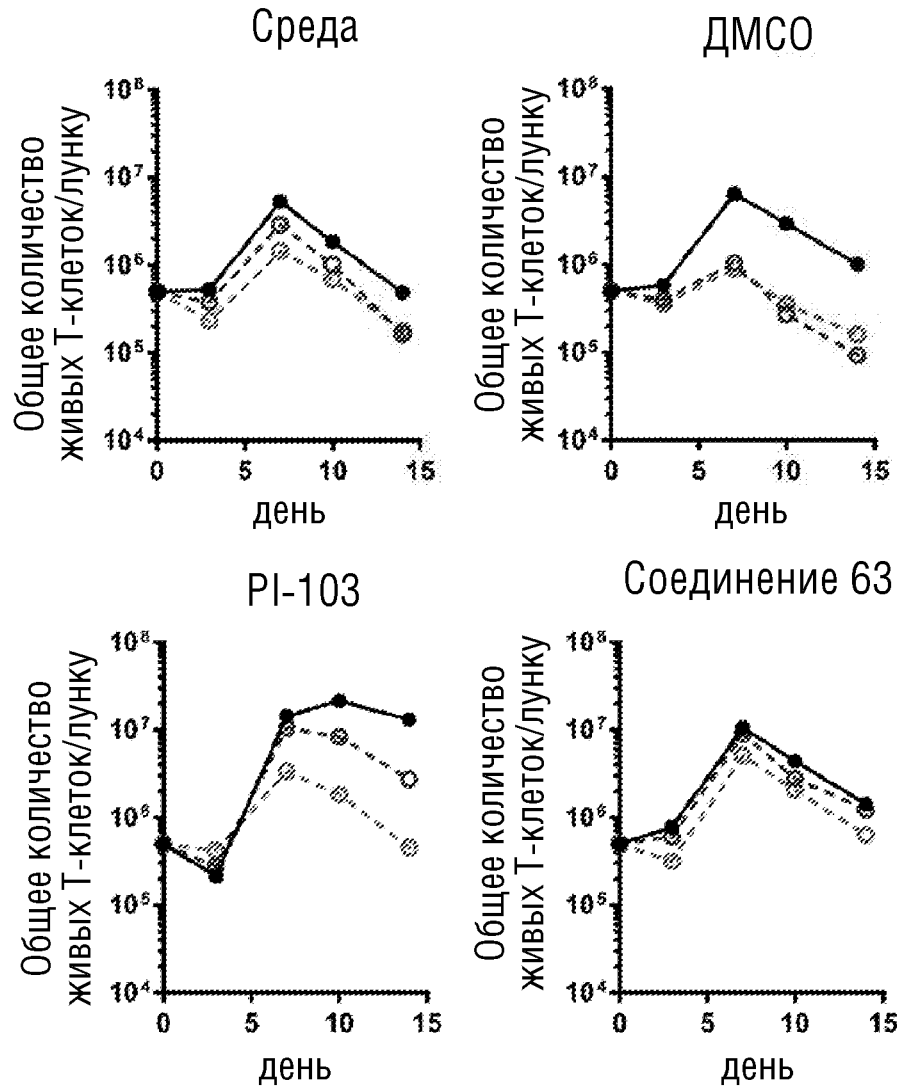
Сочетания:

- + TNF
- + IL17a
- + IL2
- + IFN $\gamma$
- + CD107a

Классическая серийная стимуляция  
CD19-K562: только CD19+K

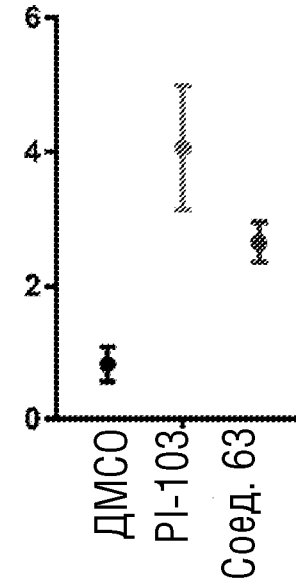


ФИГ.8А

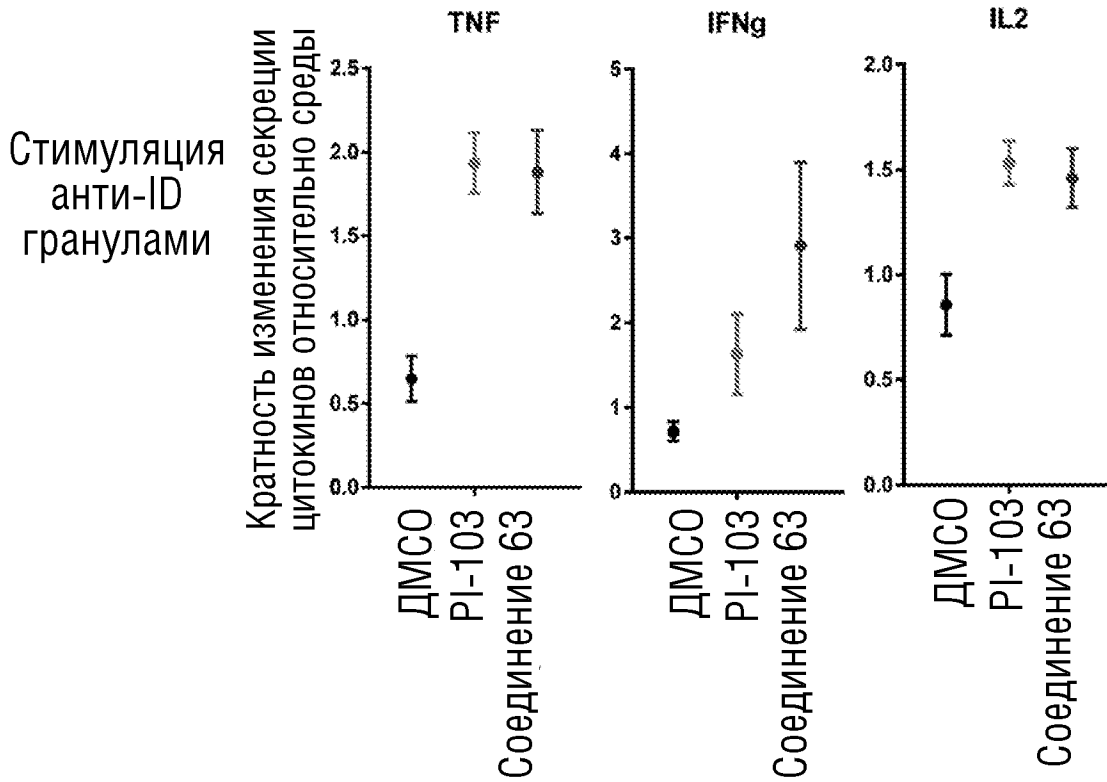


ФИГ.8В

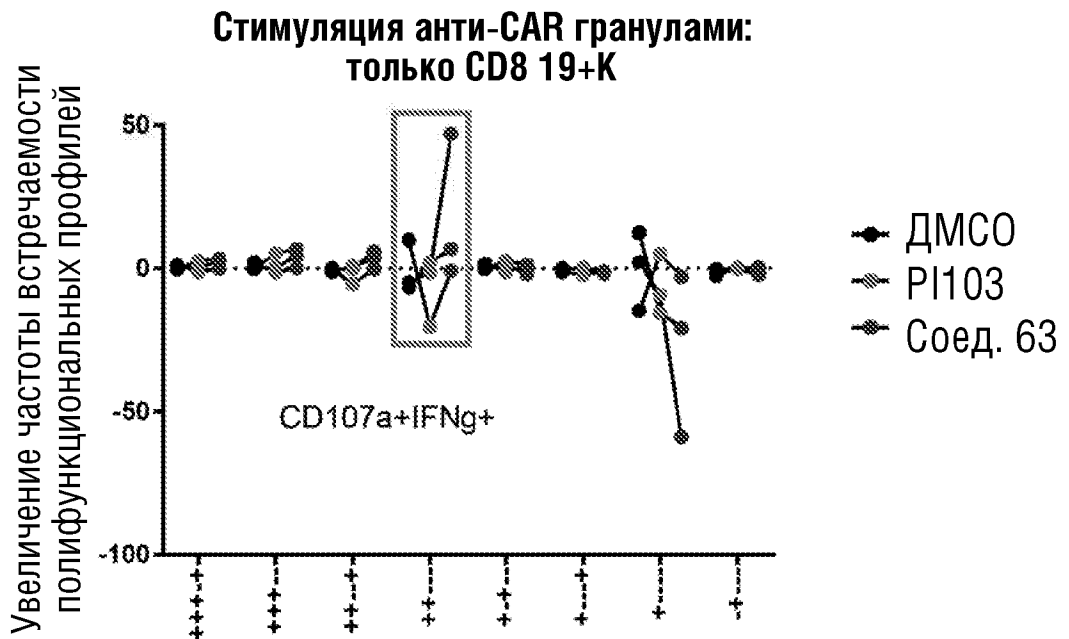
AUC относительно среды



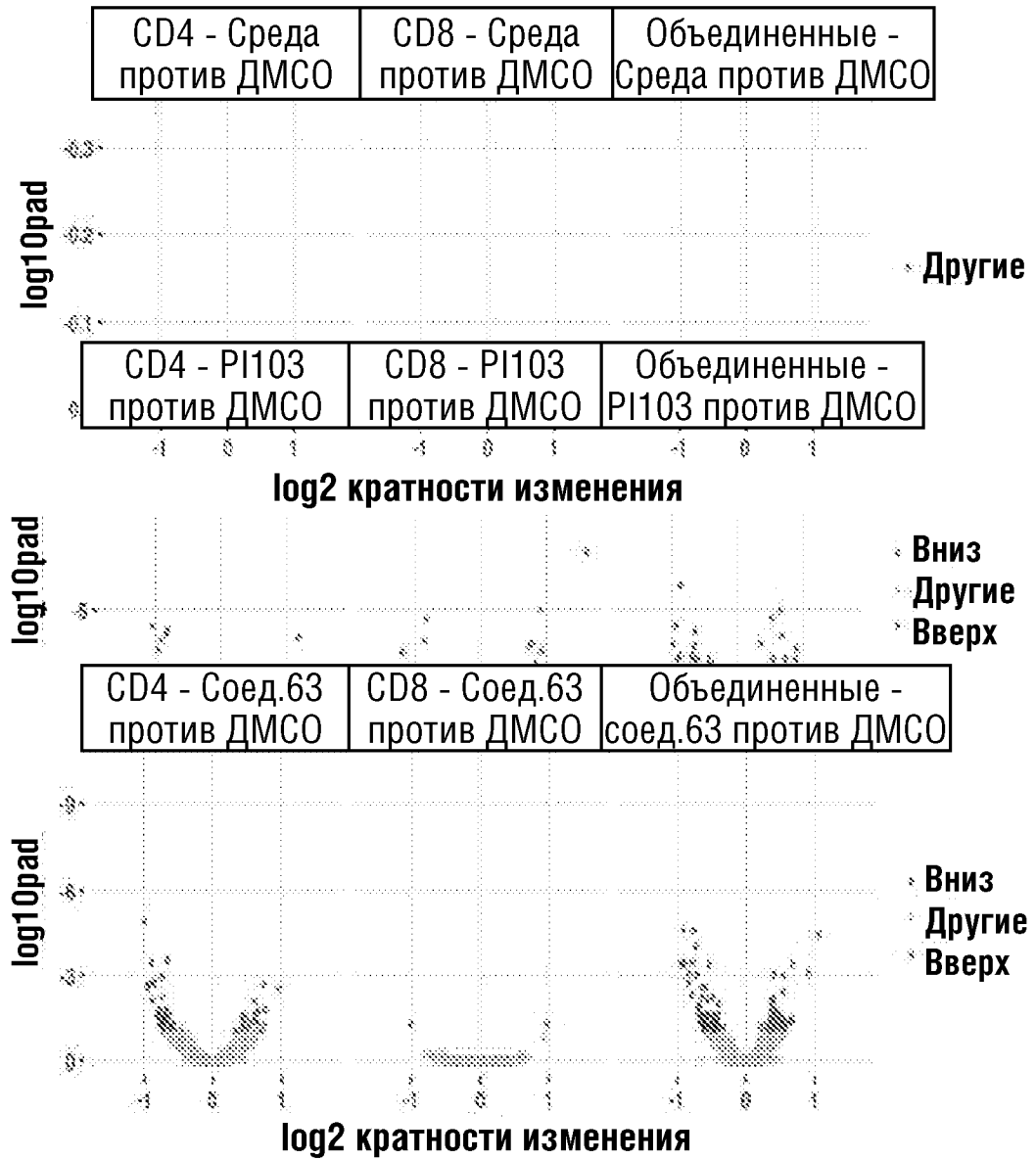
ФИГ.8С



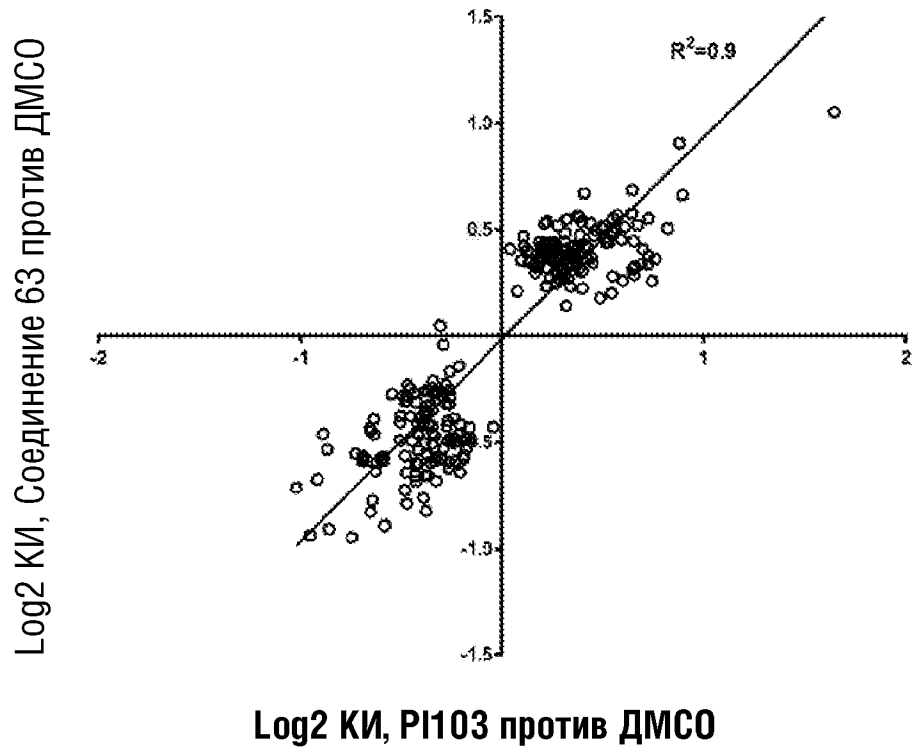
ФИГ.8D



ФИГ.9А



ФИГ.9В



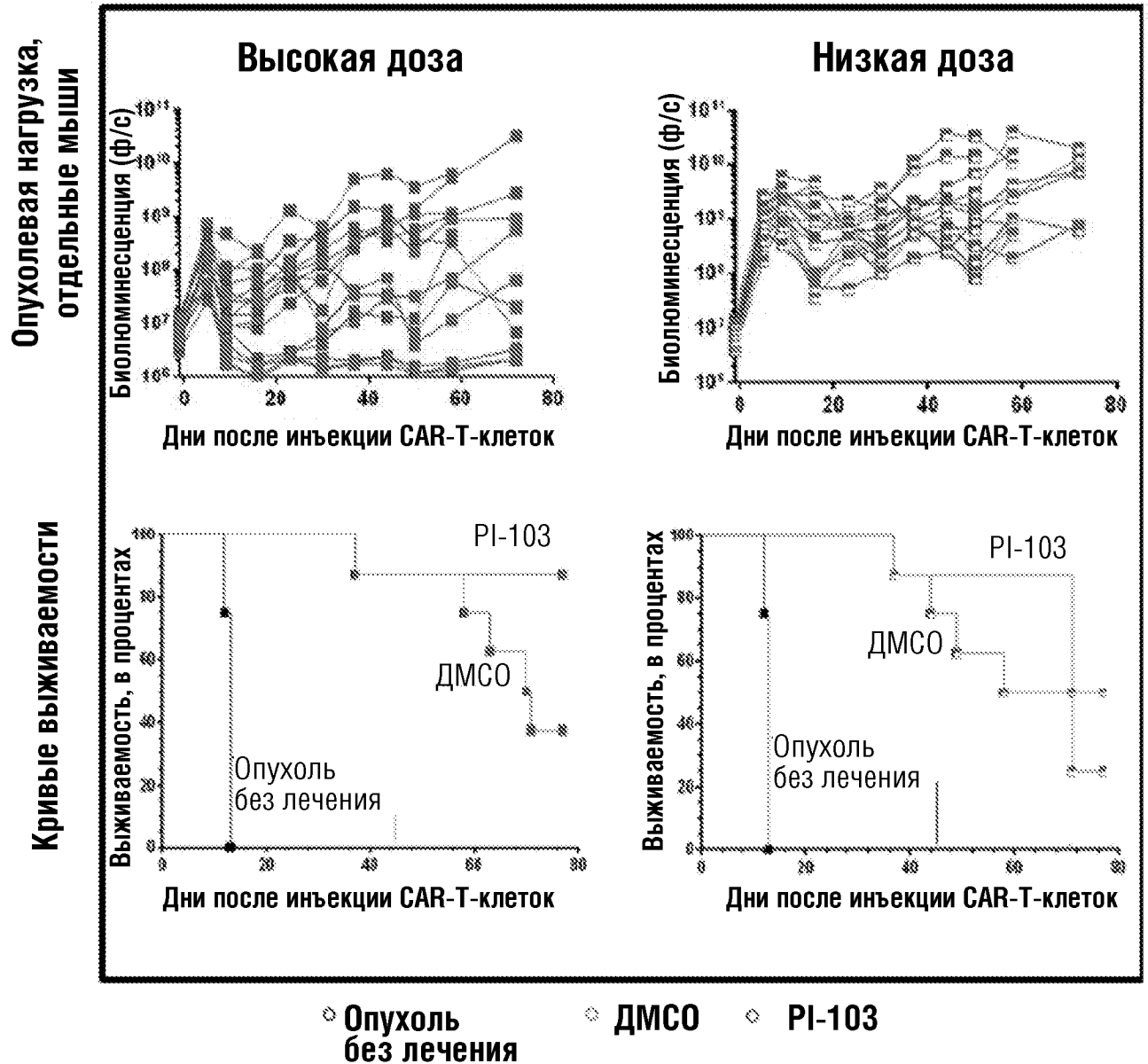


## ФИГ.9С

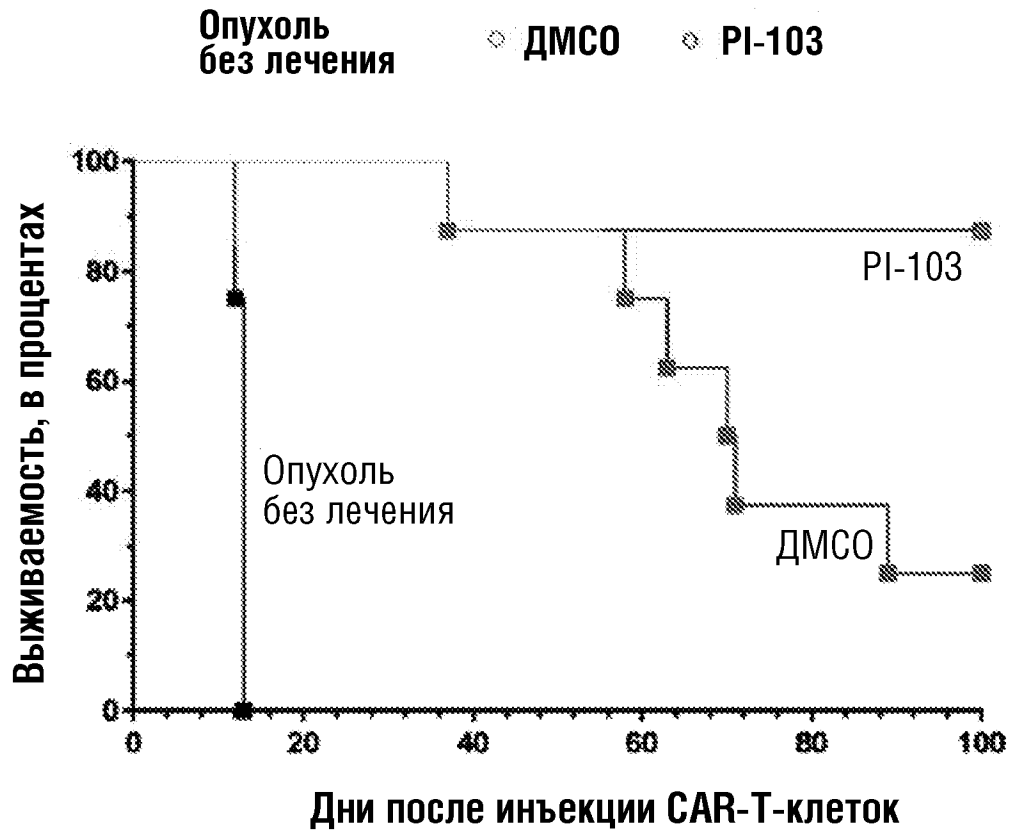


ФИГ.10А

Полученные с PI103 CAR-T-клетки

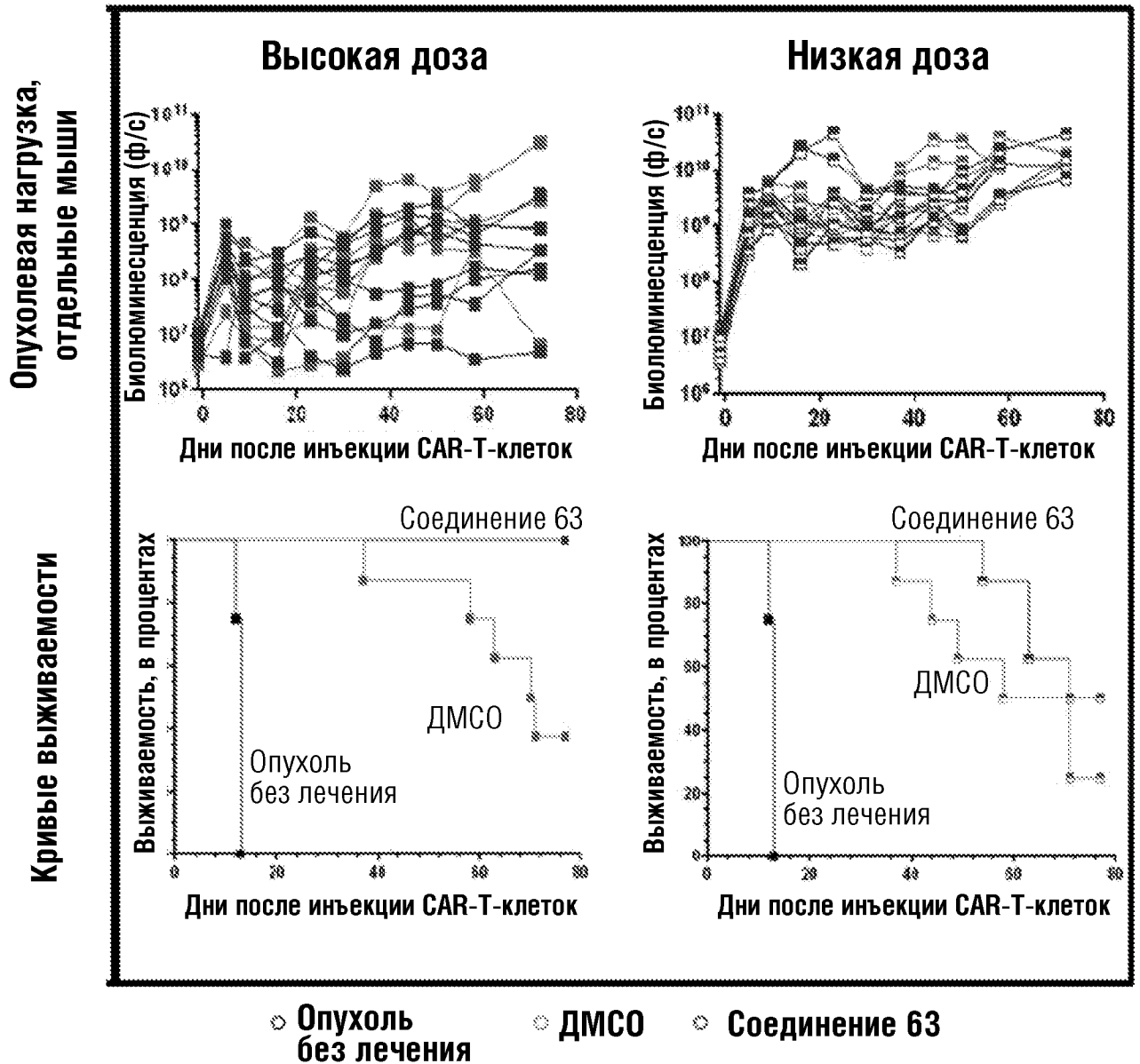


ФИГ.10В

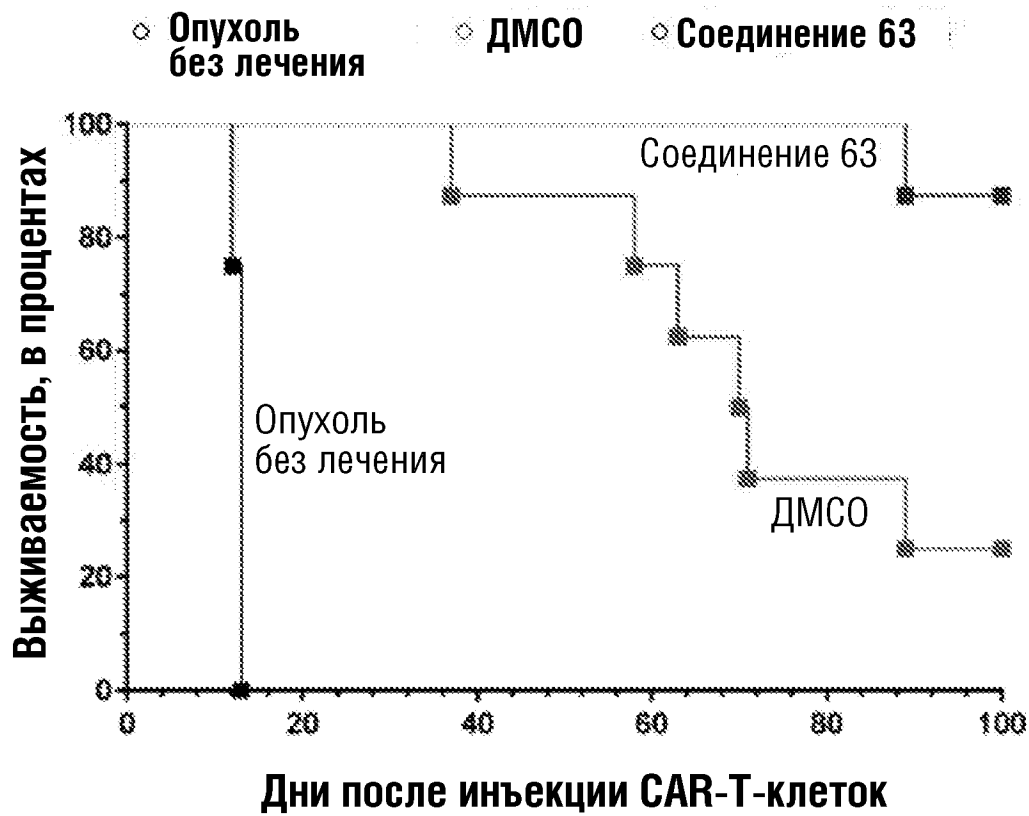


## ФИГ.11А

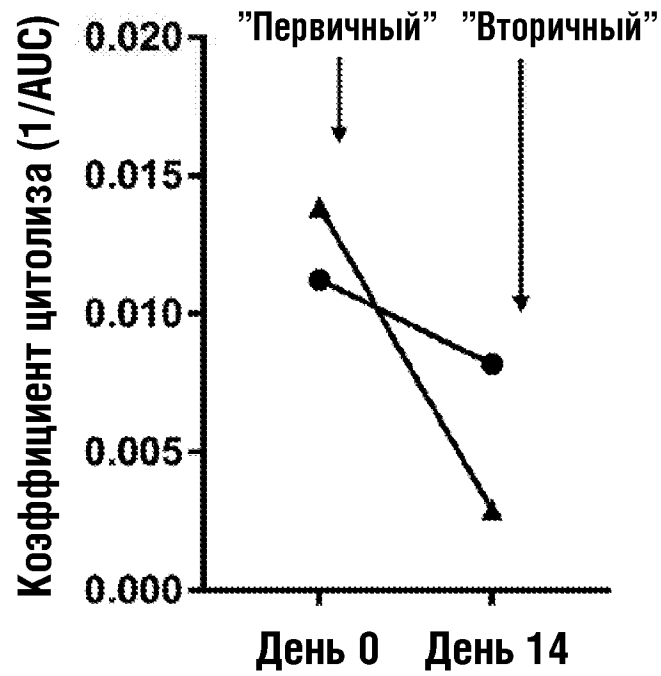
Полученные с соединением 63 CAR-T-клетки



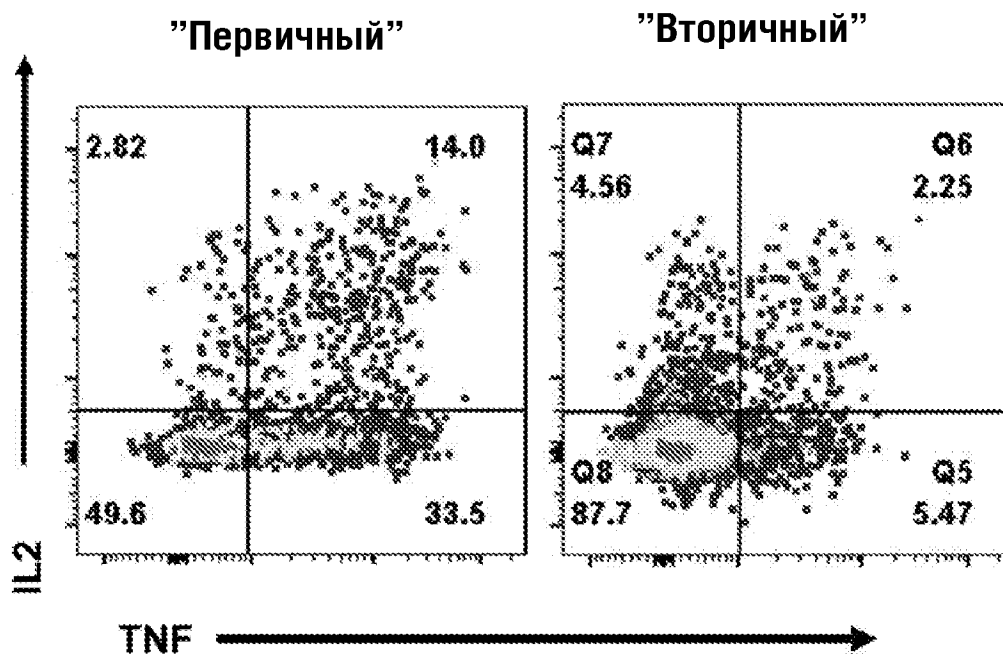
ФИГ.11В



ФИГ.12А



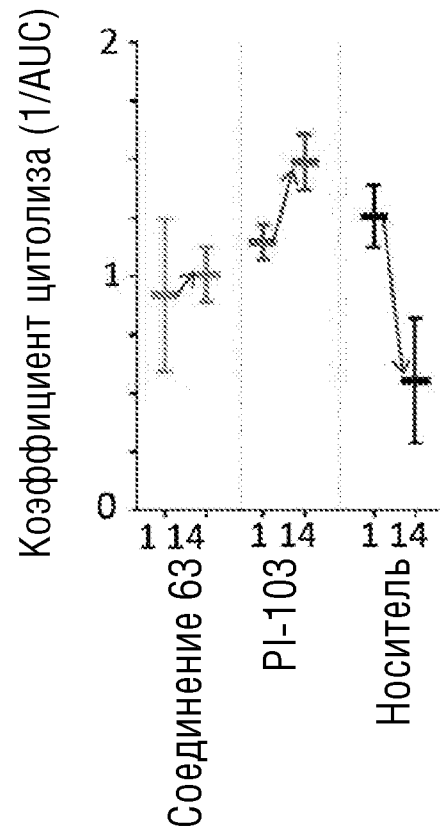
ФИГ.12В



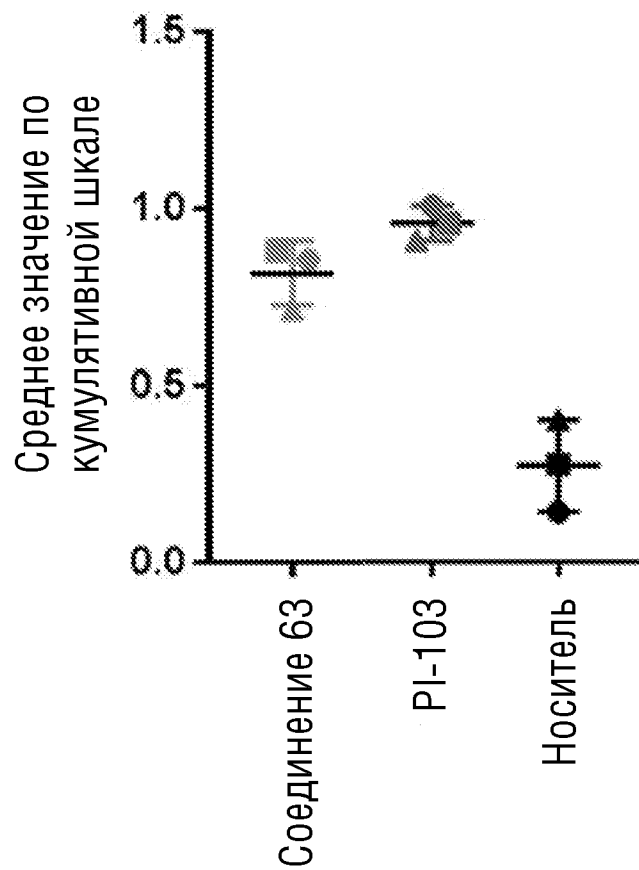
ФИГ.13А



ФИГ.13В

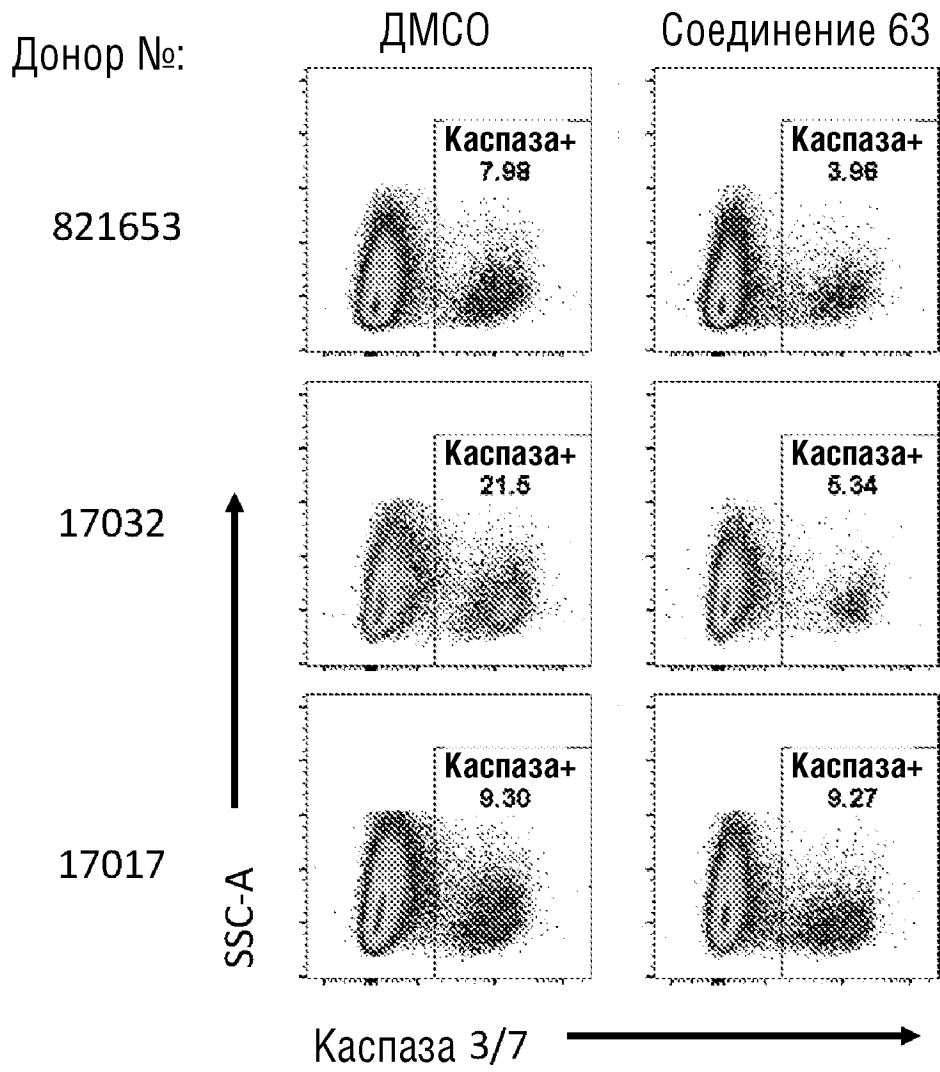


ФИГ.13С





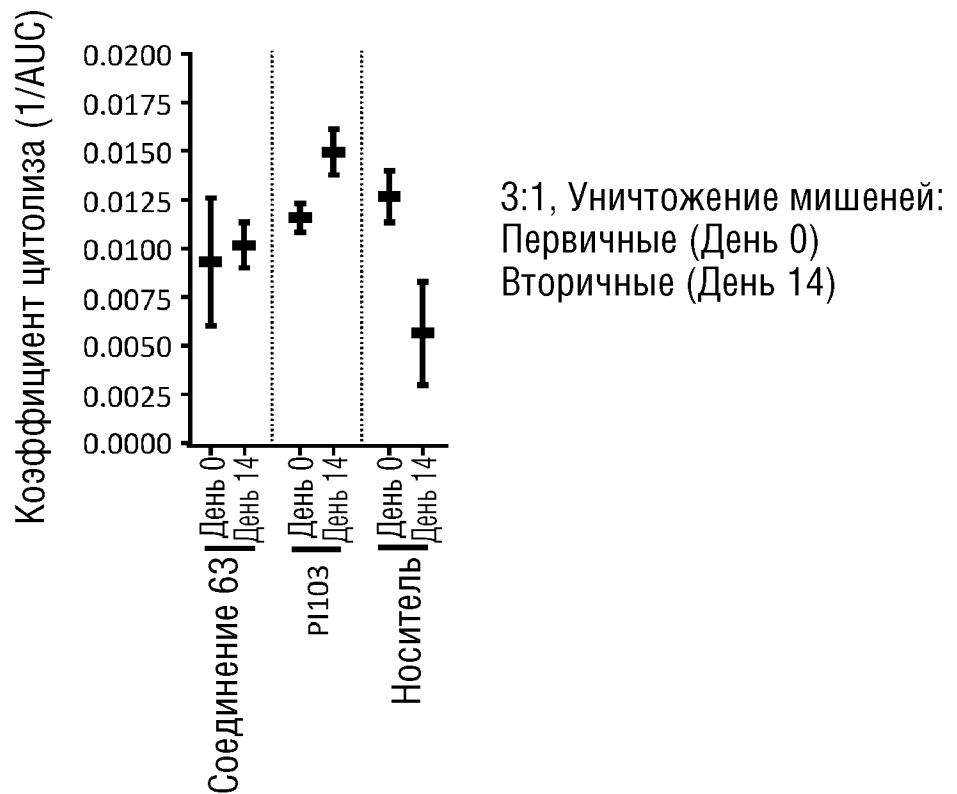
ФИГ.14



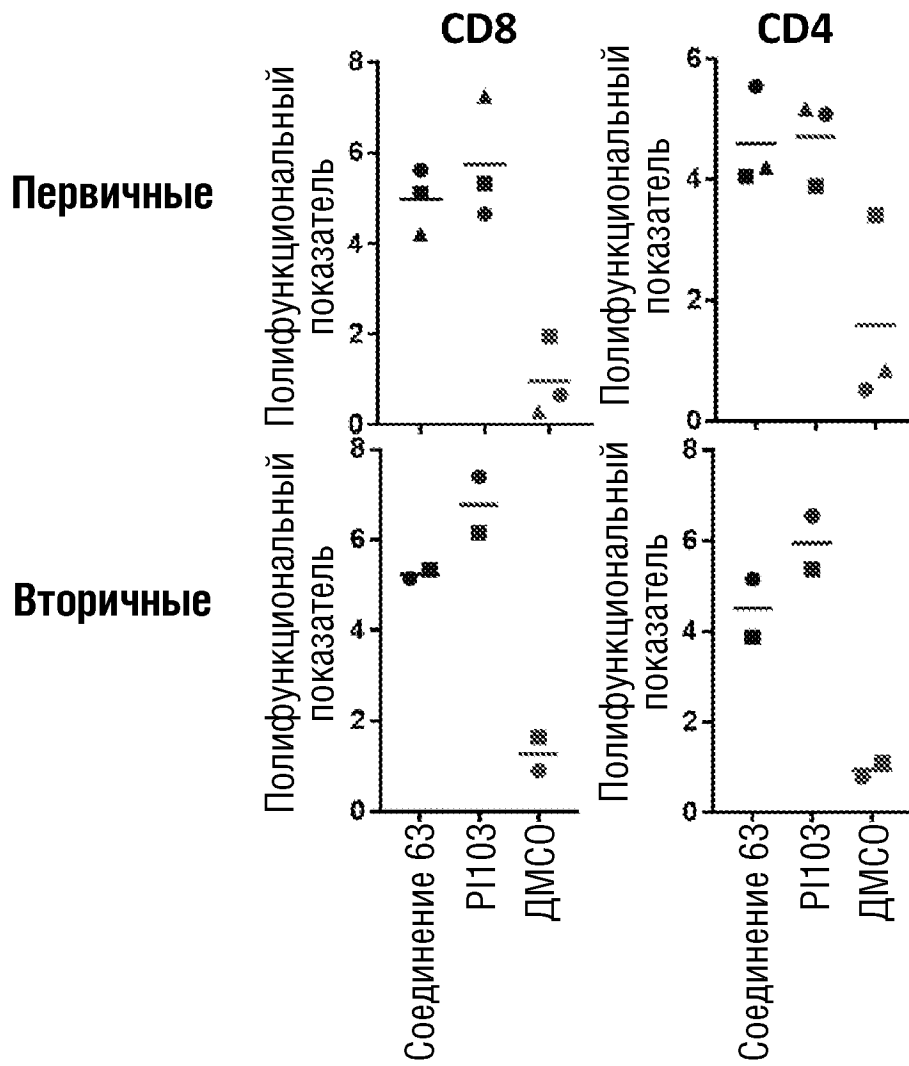
ФИГ.15



ФИГ.16

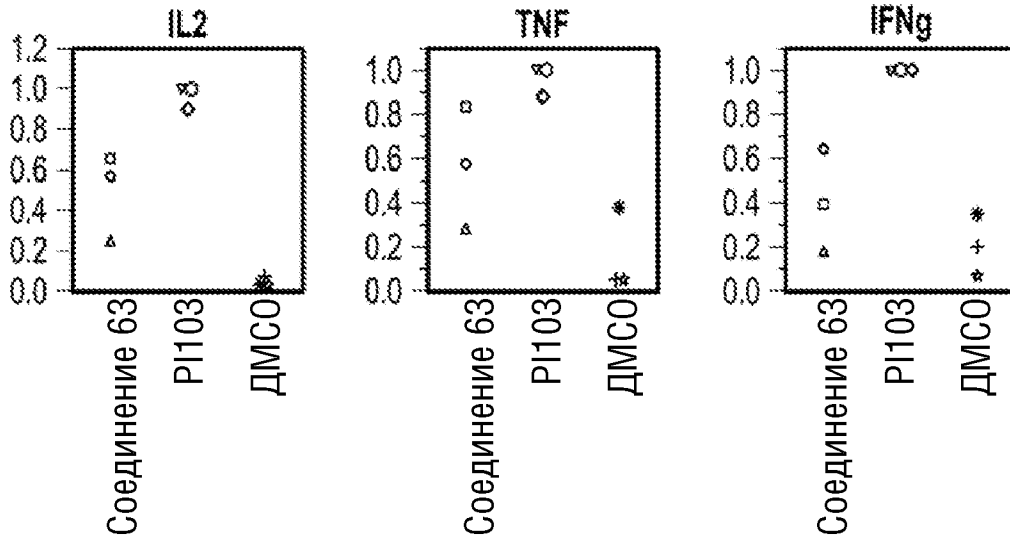


ФИГ.17А

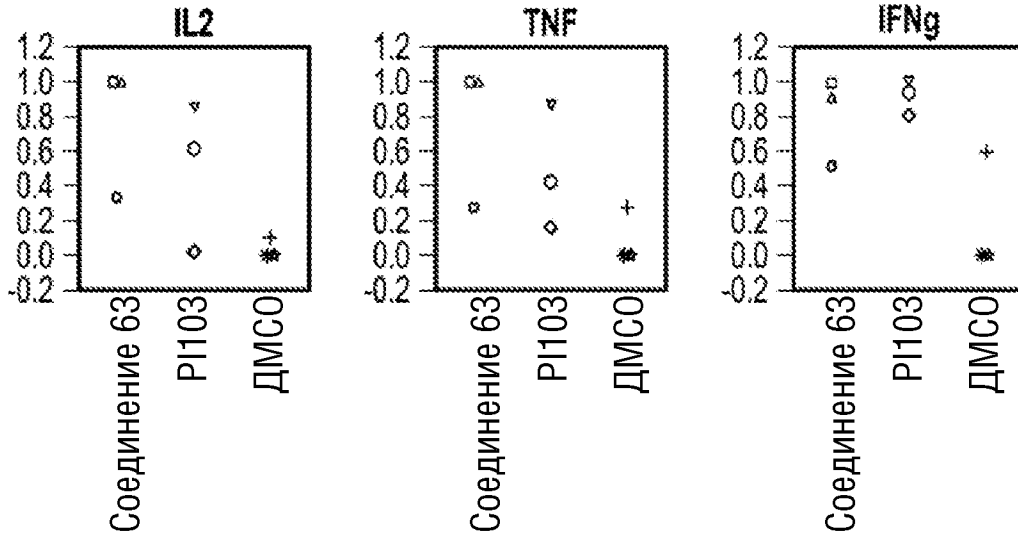


ФИГ.17В

**Первичные**

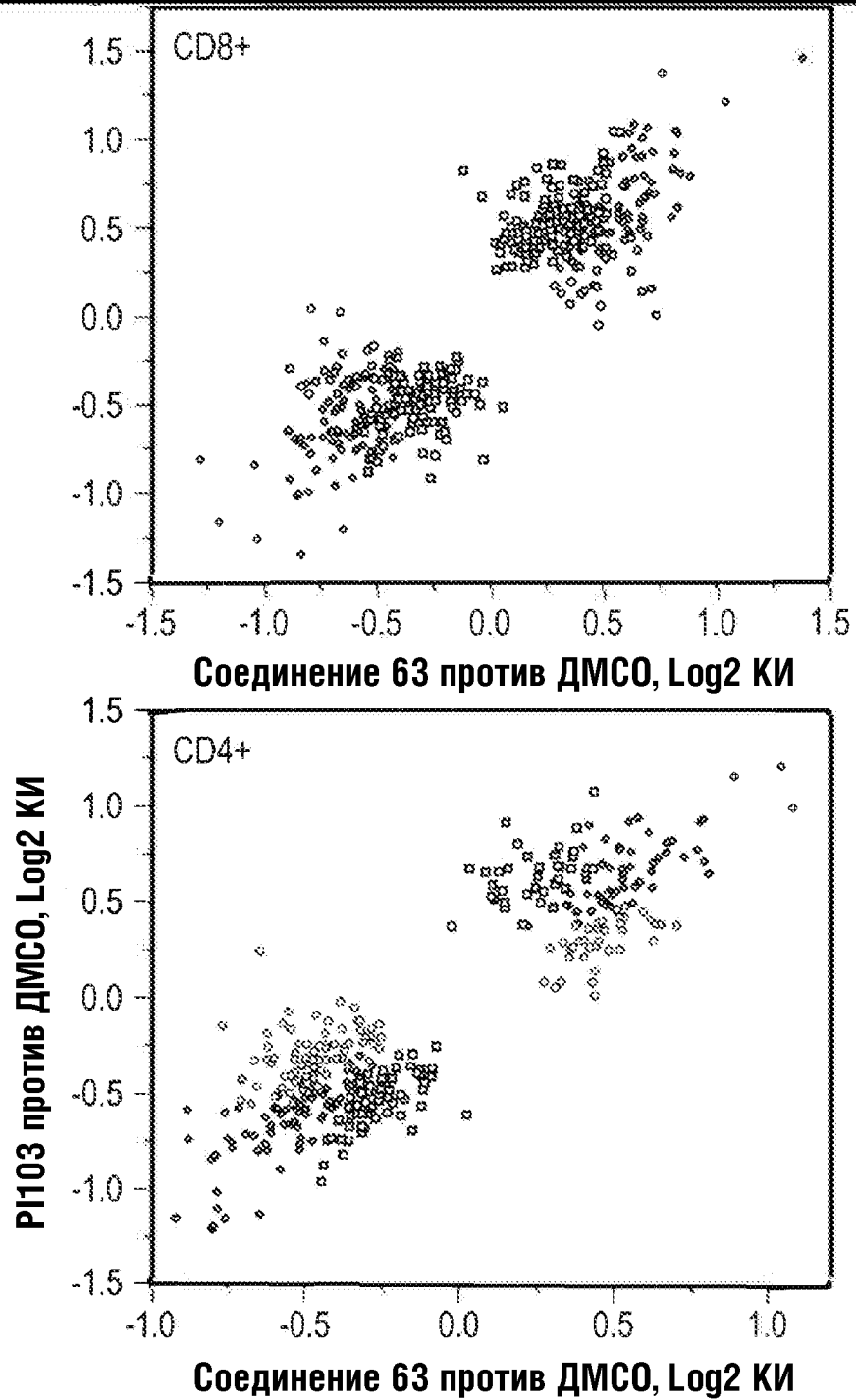


**Вторичные**

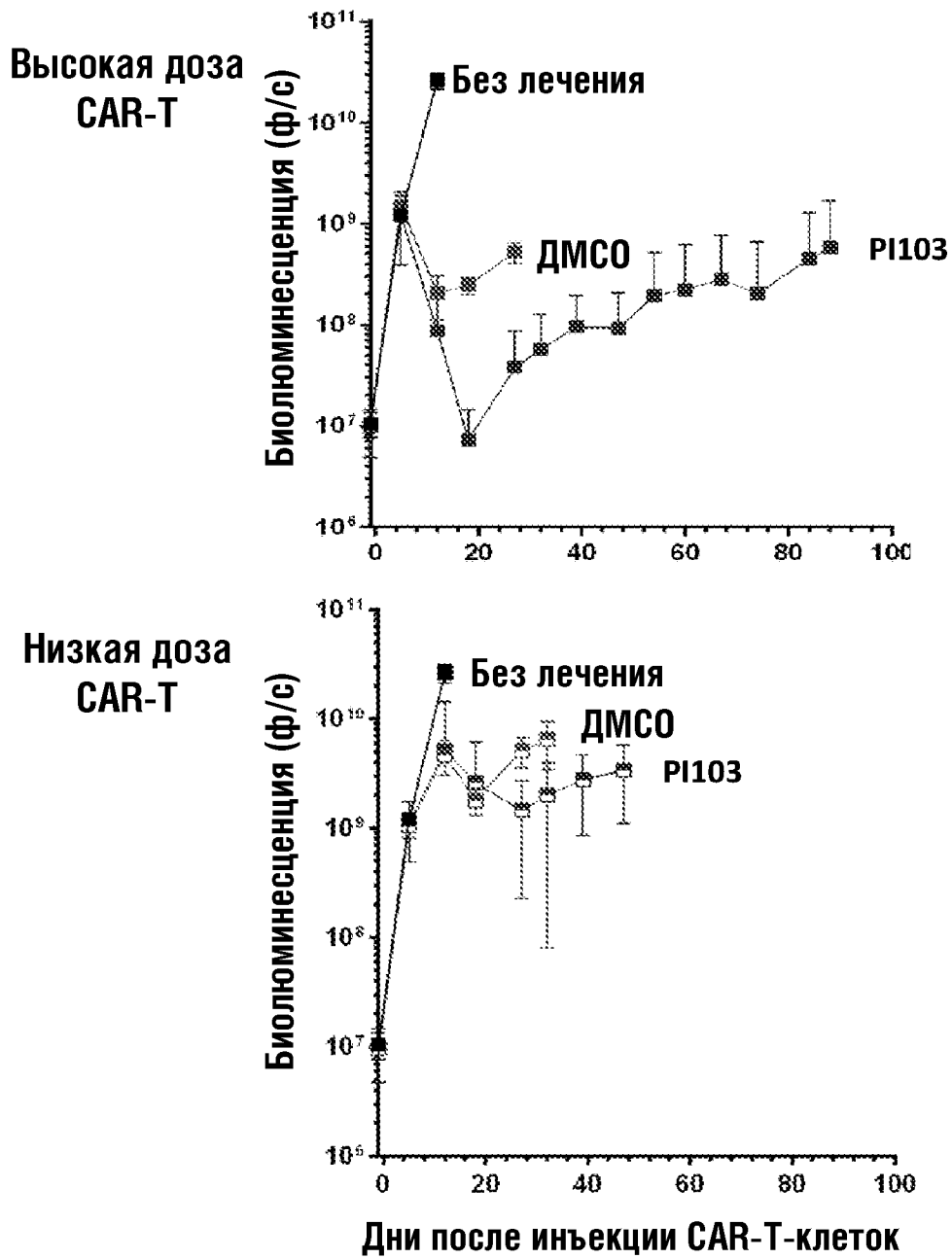


ФИГ.18

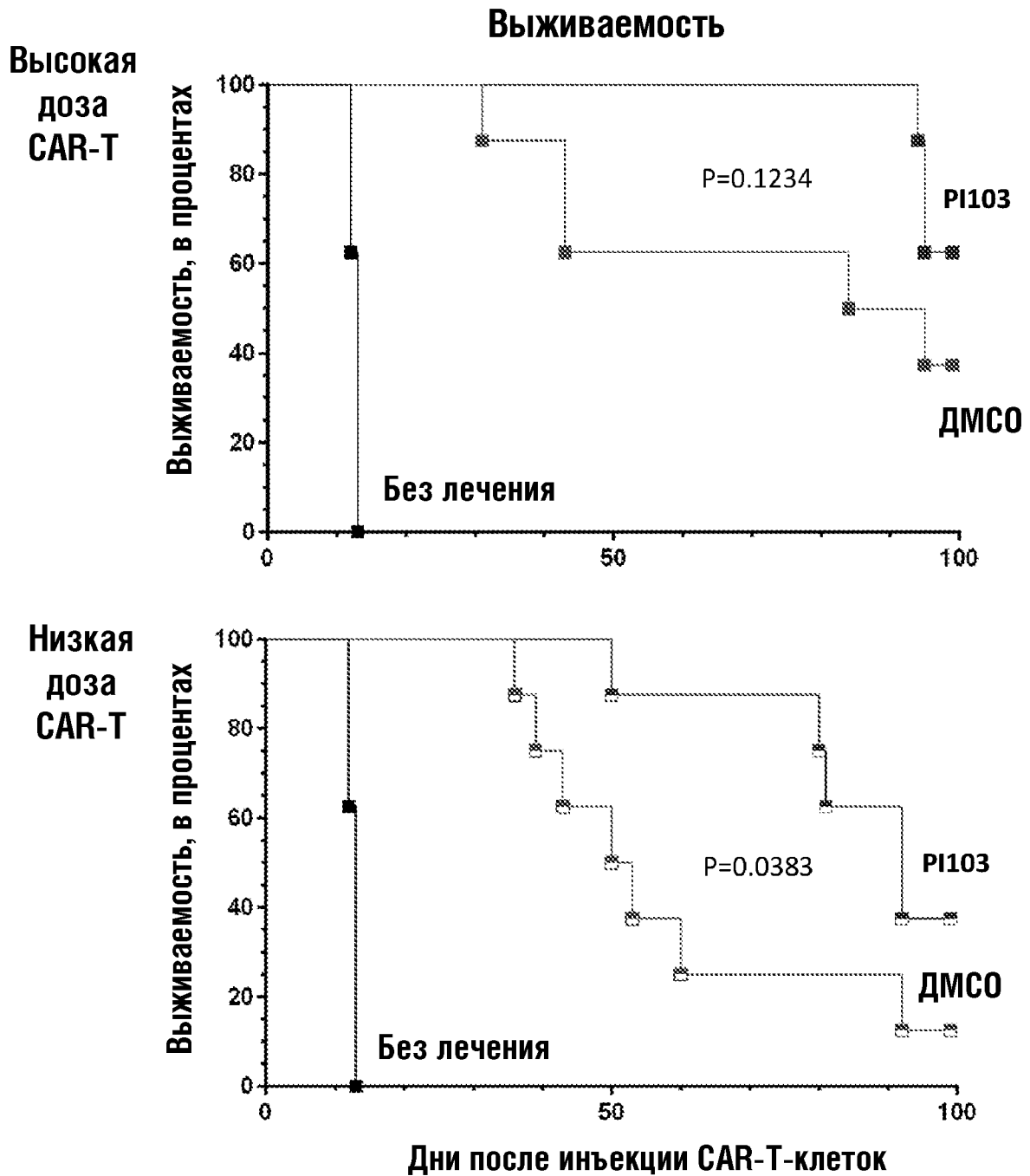
- ◊ P-скор <0,1 для P1103 и соед. 63 (перекрывающиеся)
- ◻ P-скор <0,1 для P1103, но не соед. 63 (P1103 без перекрывания)
- P-скор <0,1 для соед. 63, но не P1103 (соед. 63 без перекрывания)



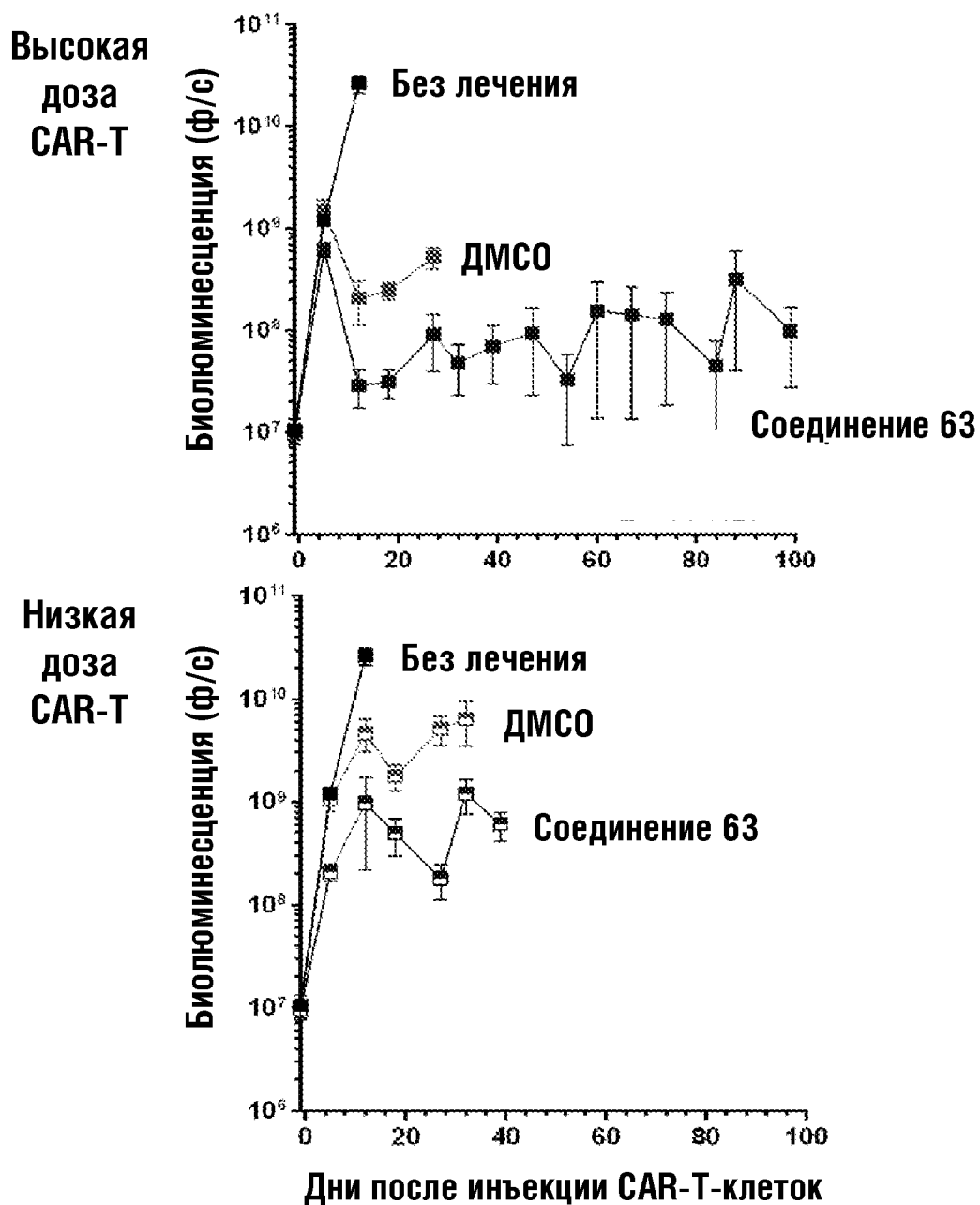
ФИГ.19А

**Опухолевая нагрузка,  
средняя для группы**

ФИГ.19В

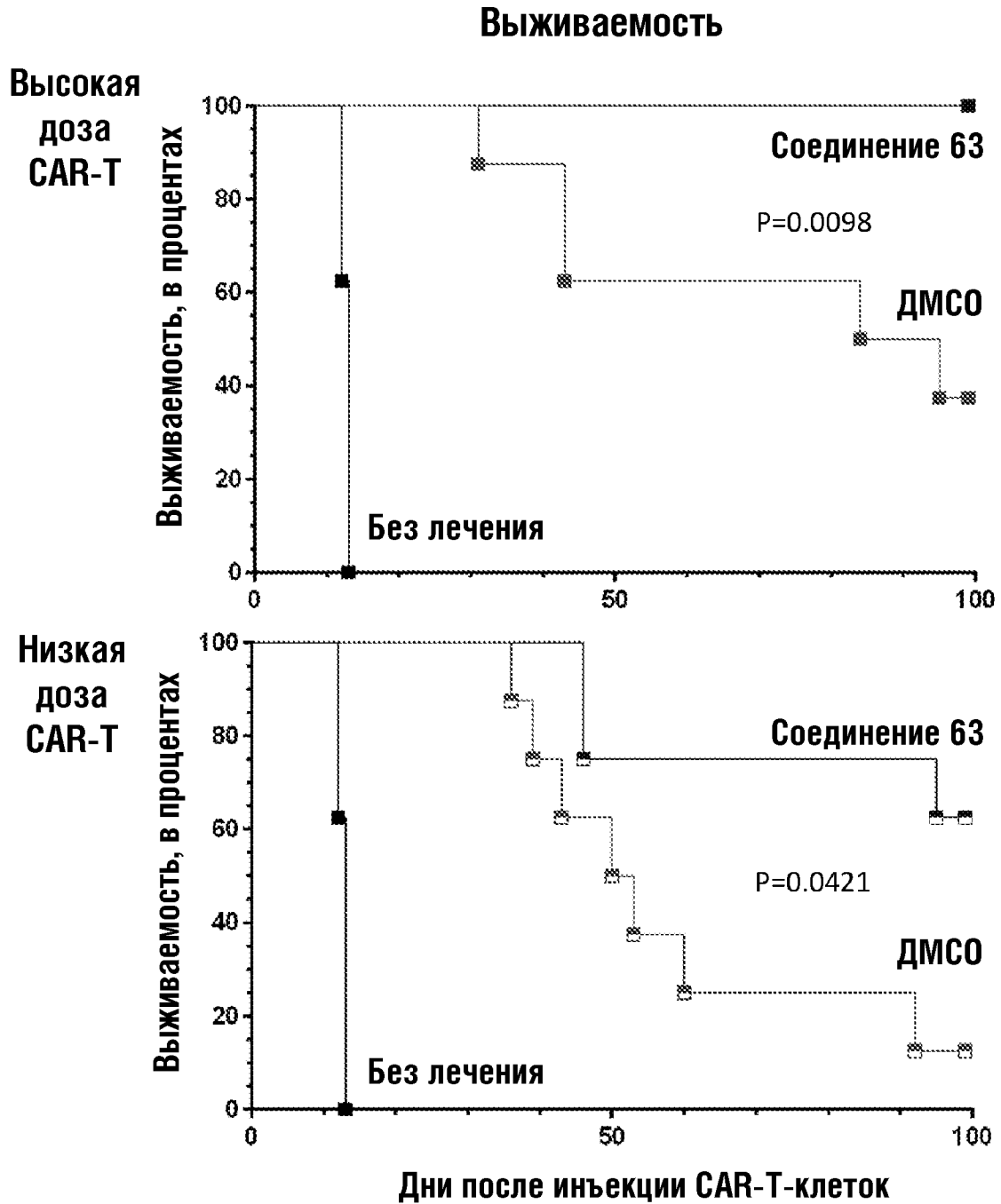


## ФИГ.20А

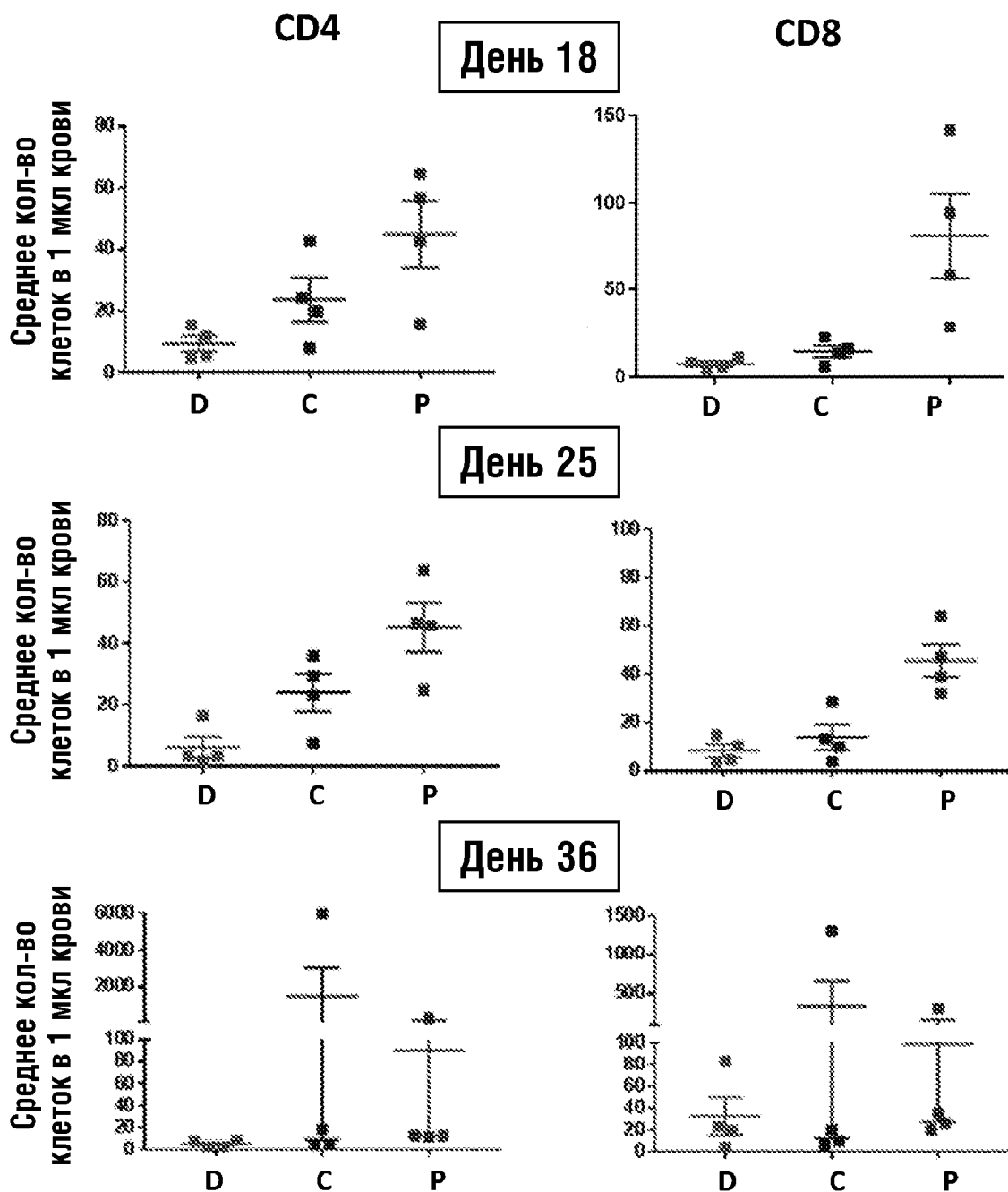
Опухолевая нагрузка,  
средняя для группы



ФИГ.20В



ФИГ.21А

Высокая доза  
CAR-T

ФИГ.21В

